Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hess

Experimentelle Untersuchungen zur Rolle der Antiproteasen beim Walker - Karzinom 256 der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

RAINER KUHN

aus Eisenach/Thüringen

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hess

Experimentelle Untersuchungen zur Rolle der Antiproteasen beim Walker-Karzinom 256 der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

RAINER KUHN

aus Eisenach/Thüringen

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 3.März 1978

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. N e u r a t h

Referent: Prof. Dr. F. H e s s

Correferent: Prof. Dr. Dr. K l ö t z e r

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	EINLEITUNG	Seite	1 - 29
	I.1. Allgemeine Betrachtungen über Enzyme	"	1
	I.2. Der Einfluß von Proteasen auf Zellkulturen	"	2 - 6
	I.3. Proteaseneinfluß in vivo	"	7 - 8
	I.4. Vergleich von Protease behandelten Normalzellen mit transformierten bzw. Tumorzellen und mit im Stadium der Mitose befindlichen Normalzellen	"	9 - 15
	I.5. Der Einfluß lysosomaler Enzyme auf die Regulation der Zellvermehrung	"	16 - 2o
	I.6. Welche Rolle spielen natürlich vorkommende Protease-Inhibitoren ?	"	21 - 23
	I.7. Protease-Inhibitoren und ihre Wirkung auf transformierte Zellen und maligne Tumoren	"	24 - 29
II.	MATERIAL UND METHODEN	"	3o - 46
	II.1. Impftechnik	"	3o
	II.2. Blutgewinnung	"	31
	II.3. Antichymotrypsinbestimmung	"	32 - 36
	II.4. Aprotinin-Nachweis im Plasma	"	37 - 4o
	II.5. Aprotinin-Nachweis im Urin	"	41
	II.6. Aprotinin-Nachweis im Tumorgewebe	"	42

II. 7. Bestimmung der Reptilase-zeit Seite 43

II. 8. Bestimmung der Gerinnungs-zeit mit dem Fibrinogen Deter-mination Set " 44

II. 9. Bestimmung der Thrombinzeit " 45

II.1o. Statistik " 46

III. ERGEBNISSE " 47 - 73

III. 1. Antichymotrypsin " 47 - 51

III. 2. Trasylol-Nachweis im Plasma Konzentration 1o.ooo KIE Trasylol " 52

III. 3. Trasylol-Nachweis im Plasma Konzentration 2o.ooo KIE Trasylol " 53

III. 4. Trasylol-Nachweis im Plasma Konzentration 8o.ooo KIE Trasylol " 54

III. 5. Trasylol-Nachweis im Urin Konzentration 2o.ooo und 8o.ooo KIE Trasylol " 55

III. 6. Trasylol-Nachweis im Tumor Konzentration 2o.ooo und 8o.ooo KIE Trasylol " 56

III. 7. Trasylol-Therapie Konzentration 8o.ooo KIE Trasy-lol, i.p., 1 Std. vor Tumor-überimpfung " 57 - 58

III. 8. Trasylol-Therapie Konzentration 1o.ooo KIE Trasy-lol, i.p., täglich " 59 - 6o

III. 9. Trasylol-Therapie
Konzentration 2o.ooo KIE Trasylol, i.p., täglich Seite 61 - 62

III.1o. Trasylol-Therapie
Konzentration 8o.ooo KIE Trasylol, i.p., täglich " 63 - 64

III.11. Reptilase-Zeit " 65 - 67

III.12. Bestimmung der Gerinnungszeit mit dem Fibrinogen-Determination-Set " 68 - 7o

III.13. Heparin-Nachweis im Plasma
Konzentration 1ooo USP-E. und 2ooo USP-E. " 71

III.14. Heparin-Therapie
Konzentration 25o USP-E., i.p., täglich " 72

III.15. Heparin-Therapie
Konzentration 1ooo USP-E., i.p., täglich " 73

IV. DISKUSSION " 74 - 83

IV. 1. Diskussion der diagnostischen Ergebnisse " 74 - 78

IV. 2. Diskussion der therapeutischen Ergebnisse " 78 - 83

V. ZUSAMMENFASSUNG " 84 - 86

VI. LITERATURVERZEICHNIS " 87 - 95

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0045

I. EINLEITUNG

I. 1. Allgemeine Betrachtungen über Enzyme

Fast alle chemischen Prozesse des lebenden Organismus werden durch katalytische Proteine kontrolliert, die wir Enzyme nennen. Sie sind die Werkzeuge des Zellstoffwechsels, mit deren Hilfe Moleküle synthetisiert, umgewandelt und destruiert werden. Ohne sie würden nur wenige biologische Reaktionen bei physiologischer Temperatur zustande kommen. Ihre Wirkung erzielen sie dadurch, daß sie die Aktivierungsenergie metastabiler Reaktionen erniedrigen. Mit anderen Worten, sie bringen die Moleküle in einen reaktionsbereiten Zustand.

Eine wichtige Gruppe der Enzyme machen die proteolytischen Enzyme aus, die auch Proteasen genannt werden. Sie ändern oder zerlegen andere Proteine, indem sie Peptidbindungen hydrolytisch aufspalten. Sie sind wichtig für eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, nehmen u.a. teil am Verdauungsvorgang, an der Blutgerinnung und an der Auflösung des Gerinnsels, beteiligen sich an Immunreaktionen und an der Befruchtung des Ovums durch das Spermium.

In den letzten Jahren haben sich Befunde gehäuft, daß die Proteasen auch an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Stimulatoren sichert offenbar den Ruhestand. Man weiß z.Z. noch verhältnismäßig wenig über das Aussehen und den Reaktionsmechanismus dieser Stoffe, insbesondere da, wo es um allgemeingültige Prinzipien ohne Organspezifität geht.

I. 2. Der Einfluß von Proteasen auf Zellkulturen

Normale Zellen einer konfluenten Zellkultur besitzen auf ihrer Oberfläche ein Erkennungssystem in Form von Antigenmolekülen, das von benachbarten Zellen und vom Immunsystem registriert und identifiziert wird (49). Die Zellen teilen und vermehren sich, bis eine bestimmte Dichte erreicht ist, bei der sie in Kontakt miteinander treten, und das Wachstum inhibiert ist (48). Vermindert man die Zelldichte, indem man einen Kratzer durch eine langsam wachsende Kultur von Hühnerembryonalzellen zieht, so reagieren die Zellen am Rande des Kratzers mit schnellerem Wachstum, bis die Konfluenz wieder hergestellt ist (24).

Einen eben solchen wachstumsstimulierenden Effekt übt eine kurze und milde Proteasenbehandlung aus. Die Zugabe einer geringen Trypsin-Konzentration zu einer 3T3-Mäusefibroblastenkultur oder Hühnerembryonalzellkultur befreit die meisten Zellen aus ihrer Kontaktinhibition. Sie teilen sich und erreichen schließlich eine Dichte, bei der sie sogar aufeinander zu liegen kommen (piling up). Nicht nur Trypsin, sondern auch andere Proteasen wie Ficin, Papain, Chymotrypsin und Pronase zeigen diese Wirkung (8, 42, 36). Diesen Befunden entspricht die Tatsache, daß 3T3-Fibroblasten zum Teil ihre Kontaktinhibition verlieren und eine gesteigerte Wachstumsrate aufweisen, wenn sie in einer Mischkultur mit Leukaemia-Zellen (L 1210) zusammengeführt werden, die sich durch eine verstärkte Proteasenproduktion auszeichnen (8). In diese Richtung weist auch ein Versuch ATTARDIS, der gezeigt hat, daß ein Protein mit Esterase- und Peptidase-Aktivität, gewonnen aus der Speicheldrüse der Maus, in einer Kultur embryonaler Muskelzellen Wachstum und Verlust der Differenzierung induziert (2).

Der wachstumsstimulierende Effekt der Proteasen läßt uns eine Auswirkung derselben auf die DNS-Syntheserate

erwarten. In der Tat kommt es nach Trypsin-Zusatz zu konfluenten Hühnerembryonalzellen zu einem gewaltigen Anstieg der DNS-Syntheserate, die, durch den Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Thymidin sichtbar gemacht, nach 6 - 7 Stunden den vergleichbaren Normalwert um das 21fache überragt (42). Die erhöhte Einbaurate beruht darauf, daß mehr Zellen ^{3}H-Thymidin einbauen und nicht darauf, daß von der gleichen Zellzahl verstärkt ^{3}H-Thymidin eingebaut wird. Ähnliche Ergebnisse hat man bei Trypsin- und Pronase-Zugabe zu Kaninchenlymphozyten festgestellt (22), sowie bei Zusatz von Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Papain, Subtilisin und Thermolysin zu isolierten Kernen von Seeigeleiern in Gegenwart radioaktiv markierten S-Adenosyl-L-Methionins. Trypsin erwies sich hier als die bei weitem effektivste Protease, steigerte die Methylierung der DNS bis auf das 2ofache des Normalen, wohingegen die Methylierung der RNS nicht beeinflußt wurde (52).

Die Autoren schließen aus, daß die Trypsinwirkung auf eine Anderung der Kernmembranpermeabilität oder eine Änderung des metabolic Pools für S-Adenosyl-L-Methionin zurückzuführen ist. Auch die Tatsache, daß Trypsin eine Substratspezifität für die basischen Aminosäureseitenketten der DNS-Histone zeigt, somit DNS-Methylierungsstellen entblößen kann, liefert keine Erklärung des Trypsin-Wirkungsmechanismus. CHATTERJEE und WALKER (11) haben bei Verwendung fast der gleichen Trypsin-Konzentration eine partielle Verringerung der Histone erst nach 3 Stunden Inkubation der Nucleohistone mit dem Enzym festgestellt, wohingegen die Inkubationszeit im oben angeführten Versuch nur 3o Minuten betrug. Ein wesentlicher Fortschritt in dem Bemühen, die Proteasenwirkung aufzuklären, wurde mit der Erkenntnis gewonnen, daß auch unlösliche, an Matrizen gebundene Proteasen, bei denen die Partikelgröße eine Endozytose und somit die direkte Einflußnahme der Proteasen auf den Kern nicht

zuläßt, dieselbe Wachstumsstimulation auslösen (10). Der direkte Angriffsort der Proteasen ist somit gegeben: Es ist die Zelloberfläche. Die Trypsin-Wirkung beruht auf proteolytischer Aktivität und ist nicht das Ergebnis einer reinen Anlagerung des Enzyms an die Zelloberfläche, da sich Diisopropylfluorophosphat substituiertes Trypsin ineffektiv erweist (8). Angriffsort und Wirkungsweise des Trypsins auf isolierte Kerne bleiben jedoch weiter im Dunkeln. Da als Folge der Proteasenwirkung auf die Oberfläche einer Zelle das Wachstum angekurbelt wird, muß eine Kommunikation zwischen Oberfläche und Kern bestehen. Folgende Möglichkeiten bieten sich an:

1. Die Permeabilität der Zellmembran wird unter Proteaseneinfluß für bestimmte wachstumsregulierende Elemente wie Ionen und Nahrungsstoffe geändert (42).
2. Trypsin inaktiviert Erkennungsstellen auf der Zelloberfläche, die die Nachbarschaft anderer Zellen registrieren und für das Verharren im Stadium der Kontaktinhibition verantwortlich sind (42).
3. Die Proteasen lösen eine Kaskade enzymatischer Reaktionen ähnlich wie bei der Blutgerinnung oder Fibrinolyse aus und stimulieren am Ende dieser Kette den Kern (8). Proteasen induzieren z.B. die Bildung von Vermittlern zwischen Oberfläche und Kern. Eine solche Vermittler- oder Botentätigkeit könnte der nach Proteasenbehandlung kurzzeitig erniedrigten intrazellulären zyklischen AMP-Konzentration zukommen (45). Verhindert man diesen vorübergehenden Abfall an intrazellulärem zyklischen Adenosin-3,5-Monophosphat, indem man dem Medium zusammen mit den Proteasen eine schwache Konzentration von zyklischem AMP zusetzt, so bleibt die Antwort der Zellen auf die Proteasenbehandlung in Form gesteigerten Wachstums aus (8, 9).

Weitere Hinweise dafür, daß auf dem Wege der proteolytischen Spaltung von Zelloberflächenbestandteilen die

Zellteilung reguliert wird, liefern folgende Befunde: Ein heute sehr gebräuchliches Mittel bei der Aufklärung der Zellmembranstrukturen sind die immunochemischen Untersuchungsmethoden, die den chemischen Testverfahren in Bezug auf ihre Spezifität überlegen sind. Ein solches immunochemisches Werkzeug sind die Agglutinine, vormals nur zur Unterscheidung von Blutgruppen eingesetzt und daher auch mit der Bezeichnung Lectine (legere = auswählen) bedacht. Sie sind Glykoproteine und reagieren mit einer Vielzahl von Kohlehydraten. Inzwischen hat man noch andere Fähigkeiten einiger Lectine aufgezeigt. So können sie z.B. unterscheiden zwischen embryonalen und erwachsenen Zellen, zwischen Mitose- und Interphasezellen und oftmals auch zwischen Tumorzellen und deren nicht transformierten Elternzellen. Diese Fahigkeiten beinhalten das Weizenkeimagglutinin und das Concanavalin A. Der Mechanismus der Agglutination, d.h. der Zusammenballung von Zellen, kann nur vermutet werden. Man nimmt an, daß das Lectin sich auf zwei benachbarte Zellen legt und diese brückenartig miteinander verbindet. Ebenso ungeklärt ist das genaue Aussehen des Rezeptors für ein Lectin. Man weiß, daß der Rezeptor auf der Zelloberfläche sitzt, und daß es unter anderem Glykoproteine sind, da man festgestellt hat, daß eine Fraktion von aus Tiermembranen isolierten Glykoproteinen in der Lage war, die Agglutination von Zellen zu verhindern, indem sie selbst eine Bindung mit dem Lectin einging. Ob auch Glykolipide als Rezeptoren dienen, ist noch ungewiß (9). Fest steht, daß normale Zellen in der Gegenwart eines Agglutinins nicht oder kaum agglutinieren (6, 36), daß sie jedoch nach kurzer und milder Proteasenbehandlung dieses Verhalten zeigen (7). Nach BURGER werden auf Grund der proteolytischen Aktivität verhüllte Membranrezeptorstellen entblößt. Diese Strukturänderung der Zellmembran geht einher mit einer Änderung der Wachstumseigenschaften. GOLDBERG hat gezeigt, daß Trypsin und Plasmin Lectinbindungsstellen auf der Oberfläche nichttransformierter

Zellen freilegen und dadurch die DNS-Synthese stimulieren (19). Denselben Effekt haben Pronase, Trypsin, Ficin, Papain, Subtilisin und Chymotrypsin auf normale 3T3-Fibroblasten, die sich im Stadium der dichteabhängigen Wachstumshemmung befinden. Sie werden agglutinabel, beginnen verstärkt DNS zu synthetisieren und durchlaufen einmal den Zellzyklus, d.h. zeigen eine Zellteilung. Danach befinden sie sich wieder im Ruhestadium, zeigen keine Neigung zu einer weiteren Teilung, was auch nicht verwundert, da ihre Oberfläche nach Reparatur des durch Proteasewirkung entstandenen Schadens wieder die nicht agglutinable Struktur aufweist (9). Ein ergänzender Befund macht darauf aufmerksam, daß Trypsinbehandlung auch zu einem Anstieg der Oberflächenflexibilität führt (36).

Die Proteasenwirkung ist das auslösende Element für die erwähnten Vorgänge. Sie startet eine Kette von Ereignissen, wobei die Präsenz der Enzyme nach Auslösung dieser Kette nicht mehr nötig ist. Die von den Proteasen induzierten Effekte besitzen nur für die Dauer eines Zellzyklus Gültigkeit, können aber bei denselben Zellen wiederholt werden (36).

I. 3. Proteaseneinfluß in vivo

Eine Proteasenwirkung analog zu den im vorstehenden Kapitel aufgeführten in vitro Fakten kann gleichermaßen bei in vivo Versuchen festgestellt werden. I.p.-Injektion von kristallisiertem Papain, Trypsin, Kollagenase und Pronase führt bei Ratten 24 Stunden nach Proteaseninjektion zu einer 30mal höheren DNS-Syntheserate in der Leber im Vergleich mit unbehandelten Normaltieren. Die gleichzeitig untersuchte DNS-Syntheserate in der Niere zeigt sich nur geringfügig erhöht. Von den untersuchten Enzymen erweist sich Papain als das bei weitem effektivste, was darauf zurückgeführt wird, daß es wahrscheinlich am besten in der Lage ist, die Capsula hepatis zu durchdringen (56). Ein ähnlicher Versuch mit "rohem" Papain zeigt, daß das Maximum der stimulierten Mitose in der Rattenleber 48 Stunden nach i.p.-Injektion erreicht wird. Eine gesteigerte Mitoserate nach i.p.-Injektion von kristallisiertem Papain kann auch in der Mäuseleber festgestellt werden. Sie zeigt sich auf die Peripherie der Leberlappen lokalisiert und deutet laut YAMAMOTO somit auf die Möglichkeit hin, daß das i.p.-injizierte Papain die Leberkapsel durchdringt, von der Peripherie aus in den Leberlappen hineindiffundiert und wie bei den in vitro Versuchen eine Umstrukturierung der Zelloberflächenarchitektur vornimmt. Um den Proteaseneinfluß auf die Oberfläche zu untersuchen, wurde eine histochemische Färbung des sauren Oberflächenmaterials vorgenommen. Papain reduziert dieses Material. Diese Strukturänderung ist jedoch nur vorübergehender Natur. 48 Stunden nach Papain-Injektion ist der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt. Das zeitweise Verschwinden von saurem Oberflächenmaterial kann zum einen auf einen direkten Angriff des Papains, zum anderen auf die als Folge der Papaingabe verminderte Glucosamin-Verwertung zurückgeführt werden (56).

Ein weiteres Beispiel für den Proteaseneinfluß in vivo liefert uns die regenerierende Leber. Wir finden

dort eine ähnliche Änderung der perizellulären Architektur. Die Leberzellen setzen nach partieller Hepatektomie endogene Proteasen wie Kathepsin frei, deren Beteiligung an der Oberflächenänderung nur allzu wahrscheinlich ist. Die Stimulation des Speicheldrüsenwachstums durch Proteasen (16) und das Vorhandensein von Peptidase- und Esterase-Aktivität in Wachstumsfaktoren von Haut, Epithel, Mesenchym und Nerven bekräftigen das.

I. 4. Vergleich von Protease behandelten Normalzellen mit transformierten bzw. Tumorzellen und mit im Stadium der Mitose befindlichen Normalzellen

Eine milde Proteaseninkubation normaler Zellen führt zu erhöhter DNS-Synthese- und Mitoserate mit Wachstumsstimulation, zu einer gesteigerten Agglutinationsfähigkeit und vorübergehendem Verlust der Kontaktinhibition. Diese Attribute müssen zu den grundsätzlichen Eigenschaften von transformierten bzw. Tumorzellen gerechnet werden. Was bei Normalzellen durch Zusatz proteolytischer Enzyme erreicht wird, scheint bei transformierten und Tumorzellen dadurch gegeben zu sein, daß diese Zellen selbst in der Lage sind, verstärkt Proteasen zu bilden.

Angaben über eine proteolytische Wirkung maligner Zellen und Gewebe findet man schon in älteren Publikationen. Bereits 1925 wird berichtet, daß Explantate von virusbedingten Hühnersarkomen eine Auflösung von Gerinnseln bewirken (17). Berichte aus neuerer Zeit unterstreichen diesen Befund. Vögel- und Säugetierfibroblasten, durch onkogene Viren und chemische Karzinogene transformiert, zeigen starke fibrinolytische Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Normalzellen, die keine oder nur sehr schwache Fibrinolyse aufweisen (34). Ähnliche erhöhte Fibrinolyse-Werte konnten in Primärkulturen chemisch induzierter Karzinome der Rattenleber und Rattenbrustdrüsen sowie in Primärkulturen chemisch- und virusbedingter Mäusebrustdrüsenkarzinome und Mäusehauttumoren festgestellt werden (54). Das vorliegende fibrinolytische System ist ein 2-Faktoren-System, das folgendermaßen enträtselt wurde: Virustransformierte Hühnerembryofibroblasten zeigen bei der Überschichtung mit Casein-Agarose anhand entstehender kleiner, klarer verstreuter Plaques, daß bei geringer Zellkonzentration ein Enzym produziert wird, das in der Lage ist, Casein zu verdauen. Bei Zusatz von Hühnerserum wird die Caseinolyse potenziert, sie steigt explosionsartig an. Da das Serum allein keine

Wirkung auf Casein ausübt, ergibt sich die Vermutung, daß ein Zymogen einer Serumprotease durch eine zelluläre Protease aktiviert wird. Als wahrscheinlicher Kandidat für diese Rolle empfiehlt sich Plasminogen, von dem man weiß, daß es durch von Zellen gebildeten Proteasen in seine aktive Form, in das Plasmin, umgewandelt werden kann. In der Tat erweist sich plasminogenfreies Serum als unwirksam, die Caseinolyse anzukurbeln, womit der Serumfaktor feststeht (20). Die Identität mit dem Plasminogen wird in einer anderen Arbeit auch auf Grund des Molekulargewichts, der katalytischen Eigenschaften, der Affinität in Chromatographiesäulen und der Reaktion mit Kationenaustauschern sichergestellt (35). Die Aktivierung durch den Zellfaktor besteht in der Umwandlung des einkettigen Polypeptids Plasminogen in das zweikettige Polypeptid Plasmin und entspricht der Aktivierung durch Streptokinase. Der Zellfaktor gehört zu den Serin-Proteasen, die als Gemeinsamkeit die Aminosäuren Serin 195, Histidin 57 und Asparaginsäure 102 zur Bildung ihres aktiven Zentrums heranziehen. Wird eine dieser Untereinheiten chemisch geändert, wird das Enzym inaktiv. Zu der Familie der Serin-Proteasen zählen neben anderen die hier erwähnten Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kollagenase und Subtilisin. Auch Thrombin ist in diese Reihe einzuordnen (54, 49).

Das Auftreten des fibrinolytischen 2-Faktoren-Systems findet sich immer im Gefolge der onkogenen Transformation einer Zellkultur. Es kann beobachtet werden in Primärkulturen spontaner, durch Viren und chemische Karzinogene induzierter tierischer Neoplasmen (34) sowie bei verschiedenen menschlichen Tumorzellarten. Der menschliche Plasminogen-Aktivator ist, wie der in transformierten Kulturen anderer Spezies gefundene, eine Serin-Protease. Die Konzentration des Zellfaktors der drei untersuchten menschlichen Tumorzellarten, ein Osteosarkom, ein Melanom und ein Mesotheliom, entspricht ungefähr der von transformierten Hühnerfibroblasten (37). Eine erhöhte

Plasminogen-Aktivator-Konzentration, die man in Gewebsproben menschlicher Tumoren nachweisen konnte, und eine Vielzahl an Berichten über eine verstärkte fibrinolytische Aktivitat von transformierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Normalzellen weisen auf eine unmittelbare Verbindung zwischen der erhöhten Zellfaktorproduktion und der Transformation hin (13, 34). So zeigen Zellen, die mit temperaturempfindlichen Mutanten von Sarkoma-Viren infiziert wurden, die erwartete erhöhte Plasminogen-Aktivator-Aktivitat. Sie zeigen bei nicht permissiver erhöhter Temperatur eine Konzentration, wie sie vergleichbare Normalzellen aufweisen, und verlieren die durch die Transformation bedingten Eigenschaften (20). Es muß jedoch erwahnt werden, daß sich die gesteigerte Produktion des Plasminogen-Aktivators nicht ausschließlich auf transformierte und Tumorzellen beschränkt und somit nicht als Diagnostikum auf Neoplasmen Verwendung findet. Vergleichbare Konzentrationen liefern auch Granulozyten, aktivierte Makrophagen, Spermatozoen und das Endometrium (37).

Der Einfluß des fibrinolytischen 2-Faktoren-Systems auf das Zellwachstum könnte laut STROUD folgendermaßen erklärt werden: Die fundamentalen Komponenten des Systems, das normale Zellen davon abhält, sich wie Tumorzellen zu verhalten, d.h. unkontrolliert zu wachsen, sind Antigenmoleküle auf der Zelloberfläche, die von Nachbarzellen und vom Immunsystem identifiziert werden. Die Antigene von Tumorzellen haben ein verändertes Aussehen, und als wahrscheinliche Folge resultiert daraus ein anderes Verhalten. In den meisten Fällen werden die Tumorzellantigene vom Immunsystem als etwas Fremdartiges erkannt und zerstört. Dennoch kommt es vor, dass transformierte Zellen wachsen können, vielleicht weil das Immunsystem mit der Wachstumsrate nicht Schritt halten kann. Wenn normale Zellen transformiert werden, findet sich ein trypsinähnliches Enzym mit ihrer Oberfläche verbunden. Dieses Enzym wird Fibrinolysin genannt, da es eine unter eine Zellkultur gelegte Fibrinmatrix aufzulösen vermag. Kurz nach dem

Erscheinen dieses Enzyms nimmt die Zelle das Aussehen und Verhalten einer Tumorzelle an. Sie beginnt unkontrolliert zu wachsen. Das Enzym besteht aus zwei Komponenten, wobei die eine von der transformierten Zelle produziert wird, die andere im Serum vorliegt. Es ist das oben erwähnte fibrinolytische 2-Faktoren-System, von einigen Autoren nur anders bezeichnet. Man vermutet, daß Fibrinolysin die Oberflächenstruktur der Zellen verändert, indem es proteingebundene Antigene ablöst, somit die Zellerkennung und die Kontaktinhibition verhindert. Auch diese Theorie bezieht sich auf die Möglichkeit, daß Proteasen über eine Änderung der Zelloberflächenarchitektur Einfluß auf den Kern und somit auf die Wachstumsregulation nehmen können.

Ein weiterer Vergleich von trypsinbehandelten normalen Zellen mit transformierten Zellen hat die Agglutinationsfähigkeit zum Inhalt. Transformierte Brustdrüsenzellen agglutinieren in Gegenwart eines Agglutinins, wohingegen normale Zellen eine solche Reaktion nicht zeigen (6). Von einer gestiegenen Sensibilität gegenüber einer Agglutination durch bestimmte pflanzliche Lectine bei transformierten Zellen sprechen auch andere Berichte (9, 28). Normale Zellen, die wenig oder gar nicht agglutinieren, zeigen, wie oben angeführt, erst nach kurzer milder Proteasenbehandlung dieses Verhalten. Die unterschiedliche Agglutinationsfähigkeit von Normalzellen und transformierten Zellen wird von einigen Autoren damit begründet, daß sie bei Polyoma Virus-transformierten 3T3 Mäusefibroblasten einen 4-5fachen Anstieg der Lectinbindungsstellen im Vergleich zu den nicht transformierten Elternzellen gefunden haben. BURGER lehnt diese Erklärung ab, da er diese geringe Zunahme an Bindungsstellen für zu schwach hält, den bis zu 30fachen Anstieg der Agglutination bewirkt haben zu können. Er unterstützt seine Behauptung damit, daß er beim Vergleich von teilweise gereinigten Lectinrezeptoren aus Membranen von transformierten Tochter- und den nicht transformierten Elternzellen keinen Unterschied in der

Konzentration feststellen konnte. Die Tatsache, daß die Elternzellen unter Proteaseneinfluß in demselben Ausmaß agglutiniert werden wie ihre transformierten Tochterzellen, ohne daß dabei, da die Proteasen frei von Glykosidasen sind, Glykoside gespalten und somit Zuckermoleküle als zusätzliche Rezeptoren für das Lectin geschaffen werden, scheint ihm Recht zu geben. BURGER hält folgende Möglichkeit für die wahrscheinlichste: Die Rezeptorstellen sind bei beiden Zellarten in der gleichen Anzahl vorhanden, liegen bei den Normalzellen jedoch in einer Form vor, die eine Agglutination nicht zuläßt (9). Nach dem z.Z. vorhandenen Wissen werden zwei grundsätzliche Möglichkeiten, die einen Anstieg der Agglutinationsfähigkeit erklären könnten, in Erwagung gezogen. Die erste bezieht sich darauf, daß die Rezeptoren bei den beiden Zellarten qualitativ verschieden sind, und daß während der Transformation ein chemisch neuer Typus an Lectinbindungsstellen geformt wird. Die zweite geht davon aus, daß die Rezeptoren gleich sind, daß im Verlauf der Transformation eine Neuordnung der molekularen Oberflächenarchitektur erfolgt. Diese Neuordnung kann darin bestehen, daß bisher verborgen gelegene Rezeptoren durch die Transformation entblößt und somit aktiv werden, daß sich Bindungsstellen zusammenballen und dadurch in der Lage sind, in engere Beziehung zu den Nachbarzellen zu treten, oder daß es zu einem gleichmäßigen Anstieg in der Dichte der Bindungsstellen kommt, was auf eine Verkleinerung der Oberfläche bei transformierten Zellen zurückzuführen wäre (9).

Mit Sicherheit kann behauptet werden, daß zwischen gesteigerter Agglutinationsfähigkeit und Tumorwachstum enge Beziehungen bestehen.

1.) Tumorzellen zeigen neben überschießendem Wachstum eine gesteigerte Agglutinationsfähigkeit.
2.) Tumorzellen, die ihre Wachstumskontrolle zurückgewonnen haben, haben ihre Agglutinationsfähigkeit verloren.

3.) Tumorzellen, die ihre Agglutinationsfähigkeit verloren haben, gewinnen in einem bestimmten Ausmaß ihre normale Wachstumskontrolle zurück.
4.) Gegen den Weizenkeim-Agglutinin-Rezeptor immunisierte Tiere konnten gegen injizierte Tumorzellen resistent gemacht werden, die ohne diesen Schutz starkes Wachstum gezeigt und die Tiere getötet hätten (9).

Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß die gesteigerte Agglutinationsfähigkeit nicht in jedem Fall die Aussage zuläßt, daß es sich bei den vorliegenden Zellen um transformierte oder Tumorzellen handelt. So z.B. agglutiniert Con A normale Lymphozyten sehr gut, wohingegen L 1210 lymphatische Leukaemia Zellen keine Zusammenballung zeigen (9). Ein weiteres Beispiel in Form von Polyoma Virus-transformierten jungen Hamsternierenzellen unterstreicht das. Sie agglutinieren in Gegenwart von Sojabohnen-Agglutinin nicht besser als die vergleichbaren Normalzellen (43).

Interessante Parallelen zeichnen sich ab beim Vergleich von Polyoma Virus-transformierten 3T3 Mäusefibroblasten (Py 3T3) mit synchronisierten, nicht transformierten 3T3 Zellen in Bezug auf ihre Agglutinationsfähigkeit. Als Parameter dient fluoreszierendes Weizenkeim-Agglutinin. Es markiert alle Py 3T3-Zellen unabhängig davon, in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zellen gerade aufhalten. Von den Normalzellen werden jedoch nur solche markiert, die sich in der Mitose befinden. Sie scheinen sonst dafür ungeeignete Oberflächenstrukturen zu besitzen. Es kommt also innerhalb des Zellzyklus während der mitotischen Phase zu einer Änderung der Oberfläche derart, daß die Normalzelle das Aussehen einer transformierten oder von Proteasen beeinflußten Zelle annimmt, und wie diese reagiert, d.h. die folgende Zellteilung einleitet. Die Autoren sehen die Änderung der Oberflächenstrukturen in dem Entblößen bisher verhüllter Agglutinin-Bindungsstellen, die bei

transformierten Zellen dauernd exponiert scheinen. Auch sie verweisen auf die Existenz einer Kommunikation zwischen Zelloberfläche und Kern, wodurch der Oberfläche wachstumsregulierende Eigenschaften zukommen. Ihr Modell geht von einem gegenseitigen Beeinflussen aus, bei dem eine alternierende molekulare Kommunikation zwischen Membran und Kern für einen kontrollierten periodischen Zellzyklus verantwortlich zeichnet. Die Oberfläche stimuliert durch ihre Änderung während der Mitose den Kern zur nächsten DNS-Replikation. Der Einfluß des Kerns auf die Membran scheint darin zu liegen, wie transformierte 3T3-Zellen zeigen, daß die abgeschlossene DNS-Synthese die nächste Mitose und die erneute Freilegung der Agglutinin-Bindungsstellen induziert (18, 9). Eine weitere Parallele zwischen normalen Mitosezellen und transformierten Zellen liegt darin, daß beide gleich viel markiertes Lectin binden, und zwar 5mal mehr als vergleichbare normale Interphasezellen anlagern. Das Absinken der zyklischen AMP-Konzentration in Mitosezellen entspricht dem Befund bei transformierten Zellen, ist in Anbetracht der bisherigen Ergebnisse nicht verwunderlich. Die Gemeinsamkeiten zwischen Mitosezellen und transformierten Zellen lassen den Vorgang der Transformation folgendermaßen ablaufen: Nach der Infektion mit einem onkogenen Virus scheint die Zelle ihre Oberflächenstrukturen nicht sofort zu ändern. Sie wartet vielmehr, bis sie in die Mitose eintritt. Hier werden ihr die für die Mitose charakteristischen Membranstrukturveränderungen auf Dauer auferlegt (9).

I. 5. Der Einfluß lysosomaler Enzyme auf die Regulation der Zellvermehrung

In den vorhergehenden Kapiteln habe ich über die Wirkung von Proteasen auf Normalzellen berichtet und auf Gemeinsamkeiten mit transformierten und Tumorzellen hingewiesen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität dieser Zellen zu stehen scheinen. Im Folgenden soll geklärt werden, welche Rolle die Proteasen enthaltenden Lysosomen bei der Wachstumsregulation spielen.

Die Funktion der Lysosomen in Normalzellen besteht darin, als intrazelluläres Verdauungssystem zu wirken. Die Zellen phagozytieren exogenes Material, indem sie es durch Einstülpungen der Zellmembran einführen. Eine solche Einstülpung wird nach innen abgeschnürt. Es entsteht eine von einer Membran umgebene Vakuole, die ins Zellinnere verlagert wird und dort mit einem Lysosom verschmilzt, das ebenfalls nur von einer Elementarmembran umgeben ist. Die in den Lysosomen enthaltenen Enzyme dienen der Verarbeitung des eingeführten Materials. Eine zweite wichtige Aufgabe kommt auf die Lysosomen zu bei Verletzung oder Tod der Zelle. Hydrolytische Enzyme werden freigesetzt, überschwemmen die Zelle und führen zu einer schnellen Autolyse. Ein Absinken des pH-Wertes nach dem Zelltod in Bereiche, die eine maximale Enzymaktivität gewährleisten, potenziert diesen Vorgang. In der lebenden Zelle verhindert die Membran der Lysosomen eine derartige Aktivität, indem sie sich als undurchlässig für intrazelluläre Substrate erweist (44, 46).

Es liegt eine Vielzahl an Befunden vor, die über eine erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme bei transformierten und Tumorzellen berichten. SYLVÈN beobachtete eine erhöhte katheptische Aktivität bei schnell wachsenden Zellen und konnte hohe Konzentrationen an Peptidasen und Kathepsin in der interstitiellen Flüssigkeit verschiedener Tumoren nachweisen. BOSMAN fand erhöhte Enzym-

aktivität saurer und neutraler Proteasen und Glykosidasen in Extrakten transformierter Fibroblasten. HARRIS und SCHENGRUND zeigten einen Anstieg weiterer hydrolytischer Enzyme in transformierten Zellen, wie Kollagenase beim Aszites-Karzinom und Neuraminidase bei transformierten Fibroblasten (36). Über stark erhöhte Konzentrationen von Kathepsin, ß-Glucuronidase und saurer Phosphatase im Haut-Karzinom der Maus berichten SHAMBERGER und RUDOLPH (44). Das Ausmaß der gestiegenen Aktivität entspricht Konzentrationen, wie sie die Leber aufweist, die ja als Organ mit großer Stoffwechselaktivität bekannt ist.

Die Frage, weshalb diese Zellen eine höhere Aktivität lysosomaler Enzyme aufweisen als vergleichbare Normalzellen, läßt sich vielleicht beantworten, wenn man die Wirkung eines Karzinogens auf die Zelle verfolgt. Man hat verschiedene Karzinogene HeLa-Zellen zugesetzt und beobachtet, daß alle Karzinogene zuerst in den Lysosomen erscheinen. SHAMBERGER und RUDOLPH halten zwei Möglichkeiten des Karzinogen-Einflusses für wahrscheinlich. Die erste bezieht sich auf eine Störung der Verdauungsfunktion des Lysosoms. Viele unverdauliche Partikel könnten sich anhäufen und die Verdauungstätigkeit einschränken, schließlich gänzlich unmöglich machen. Dem entspricht, daß die Karzinogenese einen kumulativen Prozeß darstellt, der anscheinend erst eine bestimmte Schwelle erreichen muß, bevor ein Tumor entsteht. So erschienen die ersten Tumoren erst, nachdem Mause über 5-10 Wochen taglich mit dem Karzinogen 3-Methylcholanthren Hautkontakt erhielten. Die zweite Möglichkeit des Karzinogen-Einflusses wird auf die Peroxidation der lysosomalen Lipidmembran zurückgeführt, die mit einem vorzeitigen Freisetzen hydrolytischer Enzyme antwortet. Diese beiden Möglichkeiten müssen sich nicht gegenseitig ausschließen. Die Peroxidation könnte die geometrische Isomerie der ungesättigten Fettsäuren der Lipidmembran verändern. Die Permeabilität der lysosomalen Membran

würde sich somit für verschiedene biologische Stoffe verschieben, eine Änderung in der hormonellen Kontrolle der Membran könnte daraus resultieren. In der Tat wirken verschiedene Peroxid-Verbindungen karzinogen, so z.B. ein Hydroperoxid des Cholesterols unter bestimmten Bedingungen. Auf der anderen Seite schützen Antioxidantien die Lipidmembran vor der Peroxidation (44). So konnte bei Mäusen die Angehrate von Haut-Papillomen, induziert durch Kontakt mit dem Gemisch 7,12 Dimethylbenzanthracen plus Tumor-Promotor Krotonöl, durch gleichzeitige Anwendung von Antioxidantien stark reduziert werden. Die nachgewiesene erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme bei transformierten und Tumorzellen könnte also auf eine Labilisierung der Lysosomen und auf eine dadurch bedingte erhöhte Ausschüttung lysosomaler Enzyme zurückgeführt werden.

Die Lokalisation der freigesetzten Hydrolasen kann durch das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion festgestellt werden. Kathepsin B1, eine Protease, die fast ausschließlich in den Lysosomen lokalisiert ist, wird aus Kälberleber isoliert, gereinigt und auf Kaninchen überimpft. Die anschließend hieraus gewonnenen Antikörper der Immunglobulin G-Klasse werden chemisch an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt und transformierten und Tumorzellen zugesetzt. Auf Grund seiner Größe scheint der Antikörper nicht in der Lage, tiefer gelegene Zellorganellen zu erreichen, kann deshalb keine umfassende, alle Zellbereiche einschließende Aussage über den Sitz lysosomaler Hydrolasen treffen. Er läßt jedoch klar erkennen, daß sich lysosomales Kathepsin B1 auf oder in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche und in dem angrenzenden Bereich des Zytoplasmas befindet (50).

Normale, nicht wachsende, ausdifferenzierte Zellen und unter Kontaktinhibition stehende zeigen keine Fluoreszenz, wohingegen Mitosezellen eine schwache Färbung zeigen. Das bedeutet, daß normale Zellen lysosomale Enzyme nur in der M-Phase abgeben. Dieser Befund

entspricht der Tatsache, daß die Konzentration an zyklischem AMP in Mitosezellen verringert ist. Transformierte und Tumorzellen zeigen zwar ständig Fluoreszenz im Bereich ihrer Oberfläche, die Dichte an Rezeptorstellen für den Antikörper ist jedoch ebenfalls einem regelmäßigen, vom Zellzyklus vorgeschriebenen Muster unterworfen. Prämitotische und besonders mitotische Zellen zeigen immer den höchsten Gehalt an Kathepsin B1 auf ihrer Oberfläche (50).

Im Laufe der letzten 20 Jahre konnten Substanzen mit durchaus verschiedenem chemischen Aussehen und Eigenschaften aufgezeigt werden, denen eine labilisierende Wirkung auf die Lysosomenmembran gemeinsam ist. Zu diesen Stoffen zählen u.a. das Phythämagglutin und das Concanavalin A, Trypsin, Chymotrypsin, Pronase, Papain. Die hier aufgeführten Proteasen scheinen also nicht nur eine direkte Wirkung auf die Zelloberflächenstruktur auszuüben, sondern auch eine indirekte, indem sie lysosomale Hydrolasen freisetzen, die dann auf der Oberfläche nachgewiesen werden können. In diese Richtung weist auch der Befund, daß Normalzellen nach Stimulation durch Peptone an ihrer Oberfläche durch den Kathepsin B1 spezifischen Antikörper fluoreszent markiert werden. Weiter aufzuführen wären die Phorbolester im Krotonöl, die einen Promotoreffekt haben, sowie Vitamin A und die Staphylokokkentoxine und Streptolysin S. Als labilisierend erweist sich auch eine milde hypotone Behandlung, die zu einem raschen Anstieg der proteolytischen Aktivität führt, woraus man auf eine Abgabe lysosomaler Enzyme nach Quellung der Lysosomenmembran schließen kann. Als Substanzen mit stabilisierendem Einfluß auf die Membran können außer dem zyklischen AMP noch das Purinderivat Theophyllin, das Prostaglandin E1, Cortison und Prednisolon erwähnt werden (41, 55).

In Kenntnis der Proteasenwirkung auf normale Zellen und auf Grund der Tatsache, daß

1.) transformierte und Tumorzellen generell eine

erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme an ihrer Oberfläche aufweisen

2.) normale Zellen kurz vor und während der Zellteilung ebenfalls diese Eigenschaft innehaben

3.) während der Mitose die Anzahl der Lysosomen erniedrigt ist

4.) das Zytoplasma mit saurer Phosphatase angereichert ist, besonders ausgeprägt im peripheren Bereich,

stellen einige Autoren die Theorie auf, daß es über eine Zustandsänderung der lysosomalen Membran zu verstärkter Ausschüttung lysosomaler Enzyme kommt, die den transformierten Zustand charakterisieren (38, 32, 1). Die Entfernung der für die Zellerkennung verantwortlichen Antigen-Moleküle der Zellmembran, das Freilegen der Agglutinin-Bindungsstellen, die Stimulierung des Kerns zur DNS-Replikation und das Auslösen der Mitose werden ursächlich auf die lysosomalen Hydrolasen zurückgeführt. Die Barriere in Form des physiologischen pH-Wertes der Zelle kann überwunden werden. Kathepsin B1 hat zwar sein pH-Optimum bei 5,7, seine Aktivität erstreckt sich jedoch bis auf pH 7,4, erreicht bei pH 6,7 sein halbes Maximum. Nachweise über neutrale Proteasentätigkeit bei 3T3-Zellen liegen vor und entsprechen dem Vorhandensein einer lysosomalen Protease bei polymorphkernigen Leukozyten mit maximaler Aktivität bei pH 7-7,5 (14). Die Wirkung eines gereinigten aus Leukozyten gewonnenen Lysosomenpräparates auf Lymphozyten und Makrophagen bestätigt die Verantwortlichkeit lysosomaler Enzyme bei der Wachstumsregulation. Die derart behandelten Zellen reagieren mit einer beträchtlichen Vermehrung der Blastenbildung (51). Ein weiteres Beispiel in dieser Richtung geben Streptolysin und Staphylokokkentoxin, die auf Lymphozyten mitogen wirken. Der mitogene Einfluß besteht darin, daß sie eine Abgabe von Enzymen aus Lysosomen bewirken (4). Denselben Reaktionsmechanismus weist das Phythämagglutin auf.

I. 6. Welche Rolle spielen natürlich vorkommende Protease-Inhibitoren?

Bei den natürlich vorkommenden Protease-Inhibitoren handelt es sich um höhermolekulare Polypeptide, Proteine und Glykoproteine. Sie kommen in pflanzlichen und tierischen Organismen häufig und in sehr unterschiedlicher Konzentration vor. Sie bilden mit den betreffenden Proteasen in meist reversibler Reaktion Enzym-Inhibitor-Komplexe. Durch die Bildung dieses Komplexes wird die enzymatische Aktivität des Enzyms gegenüber seinen natürlichen und synthetischen Substraten ganz oder teilweise blockiert. Die im Humanserum hauptsächlich vorliegenden Protease-Inhibitoren sind $Alpha_1$-Antitrypsin, $Alpha_2$-Makroglobulin, Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor, Antithrombin III und $Alpha_1$-Antichymotrypsin. Ihre Bedeutung im Hinblick auf die trypsinhemmende Wirkung des Serums läßt sich prozentual wie folgt verteilen: 92% Hemmwirkung entfallen auf das $Alpha_1$-Antitrypsin, 5,5% auf das $Alpha_2$-Makroglobulin, 2,2% auf den Inter-alpha-Trypsininhibitor. Über die physiologische Rolle der Antiproteasen ist nur wenig bekannt. Das qualitativ am stärksten vertretene $Alpha_1$-Antitrypsin (AAT) zeigt Inhibitorwirkung gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kollagenase und proteolytischen Enzymen menschlicher Leukozyten. Die Konzentration im Serum ist bei einer Hypo-$alpha_1$-Antitrypsinämie bei Heterozygoten um ca. 50% und bei Homozygoten um ca. 90% vermindert. BLUNDELL gibt einen Normalwert von 2,42 g AAT/l Serum an (5). 20 verschiedene Elektrophorese-Phänotypen konnten aufgezeigt werden. Die AAT-Konzentration ist bei manchen Formen des Lungenemphysems deutlich erniedrigt (23). Andere Befunde in dieser Richtung scheinen zu bestätigen, daß ein Mangel an Serum AAT mit der Anfälligkeit für eine obstruktive Lungenerkrankung in unmittelbarer Verbindung steht (15). Dieser Befund veranlaßte HARRIS und Mitarbeiter, der Frage nachzugehen, ob eine

ähnliche Beziehung zwischen AAT und dem Lungenkarzinom vorliegt. Erstaunliche Ergebnisse taten sich auf:

1.) Patienten mit inoperablem Lungenkarzinom zeigen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine signifikant erhöhte AAT-Serumkonzentration. Diese Erhöhung ist unabhängig vom vorliegenden Zelltypus des Karzinoms und wird neben dem Lungen-Ca auch bei anderen fortgeschrittenen Krebsarten gefunden (25, 47).

2.) Eine weiterführende Arbeit zeigt auf, daß eine enge Beziehung zwischen ansteigender Tumorgröße und der AAT-Konzentration im Plasma vorliegt. Frauen, bei denen ein Gebärmutterhalsabstrich das Vorhandensein eines Cervix-Karzinoms möglich erscheinen läßt, und die anschließende histologische Untersuchung diesen Verdacht bestätigt, haben bereits eine signifikant erhöhte AAT-Plasma-Konzentration, obwohl das Karzinom klinisch noch nicht sichtbar ist.

3.) Parallel zur ansteigenden malignen Entwicklung wächst die AAT-Konzentration. Im Verlauf des ständigen AAT-Anstieges kommt es zu signifikanten Erhöhungen nur dann, wenn das intraepithelial wachsende Karzinom eine Drüse oder die Basalmembran erreicht, oder wenn das Karzinom aufbricht. Das Übergreifen auf andere Gewebe oder Organe ist indes nicht mit einem signifikanten Wechsel verbunden (31).

Es drängt sich die Vermutung auf, daß die Erhöhung der AAT-Serumkonzentration eine Reaktion des Körpers auf den Krebs darstellt (31), vielleicht ein Versuch ist, die von Tumorzellen vermehrt produzierten Proteasen abzublocken und deren Wirkung aufzuheben.
Eine vorhandene signifikante Erhöhung weist jedoch nicht unbedingt auf eine maligne Erkrankung hin, da die AAT-Konzentration zahlreichen exogenen und endogenen

Faktoren unterworfen ist. Ein Anstieg liegt auch vor während der Schwangerschaft, nach Einnahme von Östrogenen und Progesteron, also auch bei Verwendung oraler Kontrazeptiva, nach Injektion von Typhus-Vakzinen, während bakterieller Infektionen und bei chronischen Erkrankungen (25).

I. 7. Protease-Inhibitoren und ihre Wirkung auf transformierte Zellen und maligne Tumoren

Maligne Tumorzellen zeigen ein gesteigertes Wachstum, Invasion in benachbarte Gewebe und Metastasierung. Sie haben eine verstärkte fibrinolytische Aktivität, eine erhöhte Agglutinationsfähigkeit und besitzen eine vermehrte Proteasentätigkeit. Viele Wissenschaftler halten einen direkten Zusammenhang zwischen den von Tumor im Überschuß produzierten proteolytischen Enzymen und der Herstellung bzw. Beibehaltung des malignen Status für gegeben. Protease-Inhibitoren blocken die Proteasenwirkung ab und müßten somit in der Lage sein, auf die phänotypischen Charakteristika transformierter und Tumorzellen Einfluß nehmen zu können (39). Die von einigen Autoren angeführte Theorie, daß die AAT-Serumkonzentration als Antwort des Organismus auf einen malignen Tumor zu betrachten ist, gibt ebenfalls Veranlassung dazu, Protease-Inhibitoren als Antitumor-Therapeutika einzusetzen und die Wirkung bei in vitro und in vivo Versuchen festzustellen.

Neben den natürlich vorkommenden Antiproteasen gibt es noch eine Vielzahl anderer Protease-Inhibitoren von unterschiedlichem Wirkungsmechanismus und unterschiedlicher Hemmungsspezifität. Man unterscheidet entsprechend der Reaktionsweise zwischen den das aktive Zentrum alkylierenden Agentien, den kompetitiven Inhibitoren, den makromolekularen Inhibitoren und ein paar anderen, die sich nicht in dieses Schema einpassen lassen.

Zu den alkylierenden Agentien zählen die Chloromethylketone. Die gebräuchlichsten von ihnen sind N-Tosyl-L-lysyl chloromethyl Ketone (TLCK) und N-Tosyl-L-phenyl-alanyl chloromethyl Ketone (TPCK). Die kompetitiven Inhibitoren sind zum einen synthetisch hergestellte Substratanaloge wie z.B. Tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), zum anderen natürlich vorkommende kleine Peptidinhibitoren wie z.B. Leupeptin. Die makro-

molekularen Inhibitoren bilden einen makromolekularen Komplex mit ihrer oder ihren spezifischen Proteasen. Zu ihren Vertretern gehören Ovomucoid und Aprotinin (Trasylol). Ein weiterer Protease-Inhibitor ist die Epsilon-Aminocapronsäure (EACA). Sie wird nicht den eben aufgeführten Gruppen zugeordnet, da sie einen anders funktionierenden Reaktionsmechanismus aufweist. Sie hemmt die Fibrinolyse, indem sie erstens die Aktivierung des Plasminogens zum Plasmin erschwert, zweitens den Angriff des Plasmins auf das Fibrin abschwächt. Die hier aufgeführten Protease-Inhibitoren stehen beispielhaft für viele andere, die auf Grund der Vielfalt an vorhandenen Protease-Hemmern unerwähnt bleiben müssen.

Ihr in vitro Einfluß auf transformierte und maligne Tumorzellen hat sich folgendermaßen dargestellt: TLCK, TPCK, TAME, Ovomucoid und Trasylol hemmen das Wachstum transformierter Py 3T3-, SV 3T3-, 3T12- und Py BHK-Zellen, zeigen aber keine Wirkung auf das Wachstum normaler 3T3- und BHK-Zellen (40). CHOU et al. berichten im Gegensatz dazu von einer Wachstumsreduzierung bei beiden Zellarten, bei normalen 3T3- und transformierten SV 3T3-Zellen (12). Ein gleichartiges Ergebnis liefern Mc ILHINNEY und HOGAN. Normale BHK-Zellen und transformierte Py BHK-Zellen wurden in fast gleichem Ausmaß durch TPCK in ihrem Wachstum gehemmt (33). ROBLIN gibt eine Interpretation dieses Faktums derart, daß er auf die Möglichkeit verweist, daß auch untransformierte Zellen Proteasen produzieren könnten, die zwar von geringer Konzentration sind, aber große Bedeutung für das Wachstum haben (39). Mögliche Nebenwirkungen der Protease-Inhibitoren, wie z.B. Hemmung der Proteinsynthese durch TLCK und TPCK, kommen ebenso in Betracht wie experimentelle Variablen. Von Bedeutung sind hier hauptsächlich die Protease-Inhibitor-Konzentration und die Zelldichte, bei der die Inhibitor-Behandlung einsetzt. Zellkulturen mit anfänglich niedriger Zelldichte zeigen eine stärkere Wachstumshemmung nach Inhibitorzusatz

und erreichen eine niedrigere Enddichte als jene, die bei Einsetzen der Inhibitorbehandlung eine höhere Zelldichte aufweisen. Einen wachstumshemmenden Effekt hat auch Leupeptin in einer Gewebskultur von SV 3T3-Zellen; auf RSV-transformierte Hühnerembryofibroblasten besitzt es diesen Einfluß nicht.

Die Agglutinationsfähigkeit transformierter und Tumorzellen wird durch Protease-Inhibitoren ebenfalls beeinflußt. Sie ist bei transformierten Zellen in Gegenwart pflanzlicher Lectine erhöht, konnte durch TLCK und TPCK bei SV 3T3- und Py 3T3-Zellen vermindert, aber nicht dem Niveau untransformierter 3T3-Zellen gleichgemacht werden. Ovomucoid zeigt denselben Effekt (21).

LATNER untersuchte den Einfluß von Proteinase-Inhibitoren auf die maligne Zellinvasion (29). Er wendete eine kombinierte Zellen/Organ Kulturtechnik an, indem er Polyoma Virus-transformierte Hamsternierenzellen mit einem Mäusenieren-Explantat überschichtete und dieses auf eine zellige Invasion überprüfte. Die Untersuchung erfolgte zum einen mit histologischen Methoden, zum anderen biochemisch mit Hilfe des Parameters Lactatdehydrogenase (LDH). LDH bildet 5 Isoenzyme. Es besteht aus H- und M-Untereinheiten. Das von den Py-Zellen produzierte LDH besteht einzig und allein aus M-Subunits, das von den Mäusenierenzellen produzierte aus beiden. Ein prozentualer Anstieg der M-Subunits im LDH-Aufbaumuster des Explantats weist somit auf seine Invasion durch die Py-Zellen hin. LATNER konnte durch i.v.-Injektion von 8.000 Kallikrein inaktivierenden Einheiten (KIE) Trasylol 1 Stunde vor Gewebsentnahme in die Schwanzvene der Mäuse die Invasion des Nierenexplantats durch die Py-Zellen signifikant eindämmen. Ein weiteres positives Ergebnis einer Proteasen-Inhibitor-Wirkung auf ein phänotypisches Charakteristikum von transformierten oder Tumorzellen betrifft die erhöhte fibrinolytische Aktivität. Diese wurde sichtbar gemacht durch oben angeführten Versuch, bei dem RSV-transformierte Hühnerembryofibroblasten mit einer Casein-Agarose-

Schicht überdeckt wurden (2o). TLCK, TPCK, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und Rinderpankreas-Trypsininhibitor erweisen sich in vitro als wirksam gegenüber den Attributen transformierter und Tumorzellen. Eine Wirkung auf Grund einer Toxizität des Inhibitors gegen die behandelten Zellen wurde durch Versuche ausgeschlossen.

In vivo Versuche bestätigen die Antitumor-Aktivität von Protease-Inhibitoren. TLCK, TPCK und TAME hemmen die Tumorgenese in der Haut von Mausen, initiiert durch einmalige Anwendung von 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) und vorangetrieben durch mehrmaliges Auftragen des Promotors Krotonöl bzw. Phorbolester. Die Protease-Inhibitoren wurden direkt auf die Haut aufgetragen, entweder zusammen mit dem Tumorpromotor oder 1-2 Stunden später (53). Über ähnliche Ergebnisse berichtet HOZUMI (27). Auch er untersuchte die Tumorgenese in der Haut von Mäusen. Als Karzinogen wurde wieder DMBA verwendet, als Promotor Krotonöl. Protease-Inhibitor war diesmal Leupeptin, das ebenfalls die Tumorgenese hemmen konnte, auf manifeste Tumoren aber wenig Einfluß zeigte. LATNER untersuchte den Einfluß von Aprotinin auf maligne Tumoren bei Mäusen und Hamstern. Er benutzte wie auch bei seinen in vitro Versuchen den polyvalenten Proteinasen-Inhibitor Trasylol, der einen nachgewiesenen Hemmeffekt auf Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminogen-Aktivierung, die Aktivierung von Gewebs- und leukozytären Proteinasen besitzt. LATNER erzeugte ein Fibrosarkom in der Rücken-Lenden-Region der Hamster durch subkutane Injektion hochmaligner Tumorzellen (BHK 21/ C 13).
Nach 4 Wochen Inkubationszeit wurden die Tumoren palpabel, die Tiere willkürlich in Kontroll- und Testgruppen aufgeteilt. Die Testtiere erhielten Trasylol, wobei die Dosierung und Applikationsart in den einzelnen Versuchen variiert wurde. Die Kontrolltiere erhielten eine quantitativ gleiche Menge an gepufferter Salzlösung. Im ersten Versuch wurden 2 mal täglich 2o.ooo KIE Trasylol subkutan in die Nähe des Tumors injiziert. Die Tiere

wurden 3 Wochen lang therapiert, anschließend die Parameter Tumorgewicht, maligne Invasion und Tumornekrose untersucht. Das Tumorgewicht konnte durch die Aprotinin-Behandlung zwar verkleinert, aber nicht signifikant verändert und die maligne Invasion nicht vollständig unterbunden werden. Die Tumornekrosen häuften sich bei den therapierten Tieren. Im zweiten Versuch wurden 2 mal täglich 1o.ooo KIE Trasylol intraperitoneal injiziert. Die Versuchsdauer betrug wiederum 3 Wochen. Die Tumormasse konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verkleinert werden. Die maligne Invasion aber wurde vollständig unterbunden, die Tumornekrosen waren signifikant erhöht. Im dritten Versuch wurde Trasylol in den Konzentrationen 2o.ooo, 1o.ooo und 5.ooo KIE 2 mal täglich direkt in den Tumor injiziert, wobei sich die kleinste Konzentration als die effektivste erwies. Ein Tumor wurde vollends zerstört und verschwand, die anderen blieben als Nekrosen zurück. Die histologische Untersuchung bescheinigte den Kontrolltumoren solide Massen an malignen Zellen, wohingegen die mit Aprotinin behandelten Tumoren Rundzelleninfiltration und absterbendes Tumormaterial aufwiesen. Ähnlich erfreuliche Ergebnisse lieferten die Mäuseversuche, bei denen ein Adenokarzinom mit Trasylol therapiert wurde, die Überlebenszeit der behandelten Mäuse signifikant verlängert werden konnte (3o). LATNER führt seine Therapieerfolge darauf zurück, daß er die proteolytischen Enzyme maligner Zellen für ein Abblocken der immunologischen Überwachung verantwortlich macht. Die Proteasen spalten einen spezifischen Antikörper, der gegen die maligne Zelle gerichtet ist und sich auf der Zellwand von T-Lymphozyten befindet, ab. Die Anti-Proteinasen verhindern das und ermöglichen somit die Kontolle über die Tumorzellen und deren Zerstörung.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es verschiedene Theorien über den Einfluß der von Tumorzellen produzierten Proteasen und über den Wirkungsmechanismus der Antiproteasen gibt. Unumstritten ist jedoch, daß Protease-Inhibitoren bei

in vitro und in vivo Versuchen Erfolge in der Beeinflussung von transformierten und Tumorzellen gezeigt haben, was mich dazu veranlaßte, der Antiproteasenwirkung unter anderen experimentellen Bedingungen nachzugehen.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden an 150-200 g schweren männlichen und weiblichen Spraque-Dawley-Ratten durchgeführt. Wir bezogen die Tiere von der Landestierzuchtanstalt Hannover. Die Ernährung erfolgte ad libitum mit Altromin- Pellets und Wasser. Wir überimpften das Walker-Karzinom 256 aus eigenen Passagen. Die tumortragenden Stammtiere für die späteren eigenen Passagen stellten uns die Farbwerke Hoechst aus Frankfurt-Hoechst zur Verfügung.

II.1. Impftechnik

Wir betäubten eine tumortragende Ratte durch i.p.-Injektion von 0,2 ml Vetalar (Firma Parke-Davis, München) der Konzentration 100 mg/ml. Wir verwendeten dafür eine Acufirm V_2A-Stahl Kanüle der Größe 16 x 11. Das Tier wurde durch Genickschlag getötet, und der Tumor in toto herauspräpariert. Sämtliches anhaftende Binde- und Muskelgewebe sowie eventuelle Nekrosen wurden entfernt. Das Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und mit einer Embryonenquetsche sowie mit Mörser und Pistill homogenisiert. Durch Zugabe von Hanks Solution (Firma Difco, Detroit) stellten wir eine Zellsuspension her. Das Verhältnis von Tumorgewebe zu Hanks Solution betrug 1:5. Die nunmehr zum Überimpfen gebrauchsfertige Tumorzellsuspension wurde in eine Spritze aufgezogen. Wir verwendeten eine Acufirm V_2A-Stahl Kanüle der Größe 14o5/15, um eine gleichmäßige Verteilung der überimpften Zellen zu erreichen, und um das Angehen der Tumoren zu gewährleisten. Die Ratten wurden durch i.p.-Injektion von 0,2 ml Vetalar der oben angeführten Konzentration betäubt. Wir injizierten 0,5 ml der Tumor-zellsuspension intramuskulär in den Nackenbereich. Ein Aliquot der Tumorzellsuspension wurde an das Hygiene-Institut der Universität Marburg zur Untersuchung auf mikrobielle Verunreinigung geschickt.

II. 2. Blutgewinnung

Wir betäubten die Ratte nach oben beschriebener Methode. Das Tier wurde durch Genickschlag getötet, der Abdominalraum, und von da aus der Thoraxraum, unter Verwendung von Präparierschere und chirurgischer Pinzette eröffnet und das Herz freigelegt. Die Blutentnahme erfolgte direkt aus den Herzkammern mit der Braun Kanüle Größe 1,1 x 30 mm (Firma Braun, Melsungen) in eine mit Heparin (Liquemin 5000, Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) benetzte Spritze. Der große Durchmesser der Kanüle und die Blutentnahme aus den Herzkammern sorgten für eine schnelle Arbeitsweise und gewährleisteten die Gewinnung hämolysefreien Blutes als Voraussetzung für die später erfolgenden photometrischen Bestimmungen mit Plasma. Der Zeitraum zwischen Tumorüberimpfung und Blutgewinnung richtete sich nach der Tumorgröße und lag je nach gewünschter Gewichtsklasse zwischen 5 und 25 Tagen.

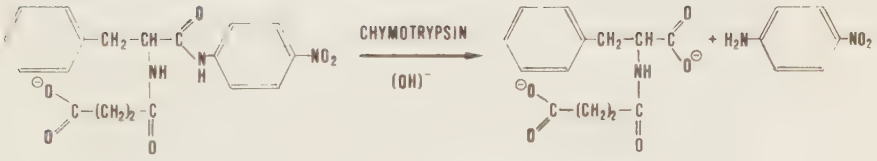
II.3. Antichymotrypsinbestimmung

Die Bestimmung des Antichymotrypsins im Plasma unserer Versuchstiere erfolgte nach der Anleitung in : H.U. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse (3). Wir behielten uns zwei Abweichungen von der vorgeschriebenen Methodik vor. Die erste bestand darin, daß wir anstelle des Serums heparinisiertes Plasma in die photometrische Bestimmung auf Antichymotrypsin einbrachten. Diese Abweichung erleichterte uns die Gewinnung hämolysefreien Blutes. Durch Voruntersuchungen stellten wir sicher, daß die Methode durch diese Abweichung nicht beeintrachtigt wird. Die zweite Abweichung bestand darin, daß wir anstelle der 12,9 mM N-3- (Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid-Lösung (CPPN) eine 12,o mM CPPN-Substrat-Lösung verwendeten, die wir durch Verdünnung des im Boehringer Testsatz auf Chymotrypsin (Firma Boehringer, Mannheim) enthaltenen CPPN auf 1:4 mit Triäthanolamin-Puffer (o,2 M Tra; pH 7, 8; o,1 M $CaCl_2$) herstellten.

Das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde 1o Minuten bei 5oo Umdrehungen/min zentrifugiert. Das hämolysefreie Plasma wurde abpipettiert.

Prinzip der photometrischen Antichymotrypsinbestimmung:

Chymotrypsin spaltet N-3-(Carboxypropionyl)-L-phenyl-alanin-p-nitroanilid in N-3-(Carboxypropionyl)-L-phenylalanin und in p-Nitroanilin.



N-3-(Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid

N-3-(Carboxypropionyl)-L-phenylalanin

p-Nitroanilin

Die Freisetzung des Chromogens p-Nitroanilin aus CPPN wurde anhand der Extinktionszunahme bei 405 nm direkt verfolgt. Bei der Zugabe von Plasma kommt es durch die im Überschuß im Plasma vorhandenen natürlichen Proteaseinhibitoren, die einen Protease-Inhibitor-Komplex mit dem Chymotrypsin eingehen, zur verminderten Spaltung von CPPN.

Herstellung der Lösungen:

Alle Lösungen wurden mit frisch destilliertem Wasser hergestellt.

1. Triäthanolamin-Puffer (o,2 M Tra; pH = 7,8; o,1 M $CaCl_2$): 18,6 g Tra und 7,35 g $CaCl_2$ x 2 H_2O in 45o ml Wasser lösen, mit 2 N NaOH auf pH = 7,8 einstellen, mit Wasser auf 5oo ml auffüllen.
2. Chymotrypsin-Lösung (1 mg Protein/ml; ca. 5o mU/ml): 1o mg Trockenpulver in 1o ml o,oo1 N HCl lösen.
3. Substrat-Lösung:
   Wir verwendeten das CPPN-Substrat (48,o mM) aus dem Boehringer-Testsatz auf Chymotrypsin, erhielten durch Verdünnen mit dem Tra-Puffer auf 1:4 eine 12,o mM Substrat-Lösung.
4. Inhibitor-Lösung:
   Das hämolysefreie Plasma wurde mit physiologischer NaCl-Lösung derart verdünnt, daß wir einen Hemmgrad zwischen 3o und 7o% erhielten. Bei 3o - 7o%iger Hemmung der Chymotrypsininaktivität ist der Hemmgrad unabhängig von der Vorinkubationstemperatur zwischen 0 und 25°C und von der Vorinkubationsdauer zwischen 1 und 15 min. Der Hemmgrad ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktionsunterschiede pro Minute (Δ E/min) des ungehemmten mit dem durch die Plasmainhibitoren gehemmten Chymotrypsinansatzes, wobei $\Delta E/min_{Chymotrypsin}$ gleich 1oo Prozent gesetzt wird, die prozentuale Differenz zum $\Delta E/min_{Inhibitor}$ den Hemmgrad darstellt.

   Wir testeten verschiedene Plasmakonzentrationen durch:

Verdünnung des Plasmas mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis von	Ermittelter Hemmgrad in %
1 : 2	54,4
1 : 3	28,7
1 : 4	22,o
1 : 8	5,1

Wir entschieden uns für die Plasmaverdünnung 1:2 mit einem Hemmgrad von 54,4%.

Bestimmungsansatz:
Wir pipettierten in die Küvetten:

	A) Inhibitoransatz	B) Chymotrypsin-vergleichsansatz
Chymotrypsin-Lösg.	o,2 ml	o,2 ml
Puffer-Lösung	1,6 ml	1,6 ml
Inhibitor-Lösung	o,2 ml	-
Die Küvetten wurden durchgemischt und 5 Minuten vorinkubiert.		
Substrat-Lösung	1,o ml	1,o ml
Wasser	-	o,2 ml
Die Küvetten wurden wiederum durchgemischt. Wir lasen 2o min lang jede 5. min die Extinktion ab.		

Messung:

Die Messung erfolgte gegen Luft.
Meßstrahlung: 4o5 nm
Schichtdicke: 1 cm
Testvolumen: 3 ml
Vorinkubationstemperatur: 25°C

Während der Messung war aufgrund eines thermokonstanten Küvettenhalters eine gleichbleibende Temperatur von 25°C vorhanden.

Präzision der Methode:

Die methodisch bedingte Fehlerbreite pro Einzelmessung liegt unter ± 8%.

Berechnung:

1 mU Chymotrypsin entspricht einer Extinktionsänderung von $\Delta E_{405} = 0{,}00332$ pro min im 3-ml-Ansatz. Entsprechend hemmt eine Inhibitormillieinheit (1 ImU) für Chymotrypsin den Δ E/min-Wert um denselben Betrag. Der Inhibitorgehalt der eingesetzten Probe ist

$$\frac{(\Delta \text{ E/min})_{\text{Chymotrypsin}} - (\Delta \text{ E/min})_{\text{Inhibitor}}}{0{,}00332} \left[\text{ImU}\right]$$

Durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor erhält man die Inhibitorkonzentration im Plasma unter Berücksichtigung der Verdünnung von 1:2 mit physiologischer NaCl-Lösung nach:

$$\frac{(\Delta \text{ E/min})_{\text{Chymotrypsin}} - (\Delta \text{ E/min})_{\text{Inhibitor}}}{0{,}00332} \times 10 \left[\text{ImU/ml Plasma}\right]$$

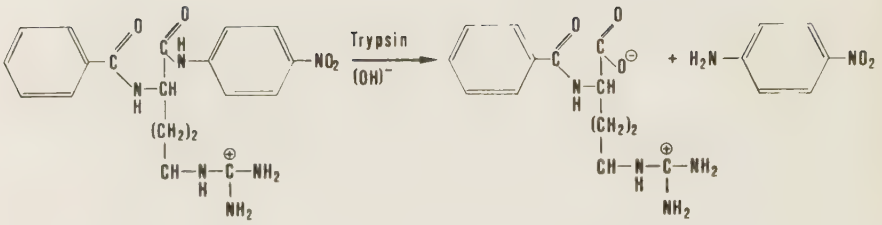
II. 4. Trasylol-Nachweis im Plasma

Der Trasylol-Nachweis im Plasma erfolgte entsprechend der Anleitung in H.U.BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse (3) mit der bereits erwähnten Abweichung, daß wir nicht Serum sondern heparinisiertes Plasma in die photometrische Bestimmung einbrachten.

Wir injizierten Trasylol (Firma Bayer, Leverkusen) i.p., gewannen von den derart behandelten Tieren Blut nach oben beschriebener Methode. Durch Zusatz 6%iger Perchlorsäure wurden alle Proteine, also auch die im Plasma vorkommenden natürlichen Protease-Inhibitoren, ausgefallt. Der säurestabile Proteinasen-Inhibitor Trasylol blieb von der Perchlorsäure unangetastet im Plasma zurück. Eine Hemmung der Substratspaltung durch Trypsin konnte folglich nur auf das Trasylol zurückgeführt werden. Der Nachweis des Trasylols im Plasma belegt, daß der Proteinasen-Inhibitor auf dem Blutwege den Tumor erreicht und wirksam werden kann.

Prinzip der photometrischen Bestimmung:

Trypsin spaltet N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid in N-Benzoyl-arginin und in p-Nitroanilin. Die Freisetzung des Chromogens p-Nitroanilin aus N-Benzoyl-arginin-p-nitro-anilid (BAPNA) wurde anhand der Extinktionszunahme bei 405 nm direkt verfolgt.



N–Benzoyl-arginin-p-nitroanilid **N–Benzoyl-arginin + p-Nitroanilin**

Herstellung der Lösungen:

Alle Lösungen wurden mit frisch destilliertem Wasser angesetzt.

1. Triäthanolamin-Puffer (0,2 M Tra; pH = 7,8; 20 mM $CaCl_2$): 18,6 g Tra und 1,47 g $CaCl_2$ x 2 H_2O in 450 ml Wasser lösen, mit 2 N NaOH auf pH = 7,8 einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen.
2. Trypsin (50 g Protein/ml; 50 mU/ml:
   500 g Trypsin in 10 ml 0,001 N HCl lösen.
3. Substratlösung (2,2 mM):
   50 mg BAPNA in 50 ml Wasser durch Erwärmen im Wasserbad lösen.
4. Inhibitorlösung:
   Wir versetzten 1 ml Plasma mit 1 ml Eiswasser und mit 2 ml 6%iger Perchlorsäure. Durch 10 minütiges

Zentrifugieren bei 3000 U/min trennten wir den Niederschlag ab. Wir entnahmen 3 ml des Überstandes und stellten diesen mit 5 M K_2CO_3-Lösung auf pH 4-7 mittels pH-Papier ein. Nach 1 stündigem Stehen im Kühlschrank (0-4°C) wurde die überstehende klare Lösung (Inhibitorprobe) vom ausgefallenen Kaliumperchlorat abdekantiert. 0,1 ml dieser Inhibitorprobe werden in den photometrischen Test eingebracht.

Bestimmungsansatz:

Wir pipettierten in die Küvetten:

	A) Inhibitoransatz	B) Trypsinvergleichsansatz
Trypsin-Lösung	0,2 ml	0,2 ml
Puffer-Lösung	1,7 ml	1,8 ml
Inhibitor-Lösung	0,1 ml	-
Die Küvetten wurden durchgemischt und 5 Minuten vorinkubiert.		
Substrat-Lösung	1,0 ml	1,0 ml
Die Küvetten wurden wiederum durchgemischt. Wir lasen 5 min lang jede min die Extinktion ab.		

Messung:

Die Messung erfolgte gegen Luft.
Meßstrahlung: 405 nm
Schichtdicke: 1 cm
Testvolumen: 3 ml
Vorinkubationstemperatur: 25°C
Während der Messung war aufgrund eines thermokonstanten Küvettenhalters eine konstante Temperatur von 25°C vorhanden.

Präzision der Methode:

Die methodisch bedingte Fehlerbreite pro Einzelmessung liegt unter ± 5%.

Berechnung:

Die Berechnung entspricht mit Ausnahme des Verdünnungsfaktors der oben angeführten Berechnung für Antichymotrypsin. Die Verdünnung beträgt hier 1:4 (1 ml Plasma + 1 ml Eiswasser + 2 ml 6%ige Perchlorsäure), sodaß sich die Trasylolkonzentration im Plasma folgendermaßen berechnet:

$$\frac{(\triangle E/min)_{Trypsin} - (\triangle E/min)_{Inhibitor}}{0{,}00332} \times 4o \left[\text{ImU/ml Plasma} \right]$$

II.5. Trasylol-Nachweis im Urin

Der Trasylol-Nachweis im Urin erfolgte ebenfalls entsprechend der Anleitung in H.U.BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse (3).

Wir injizierten den Proteinasen-Inhibitor Trasylol i.p.. Die Tiere wurden dann nach Ablauf einer bestimmten Zeit durch i.p. Injektion von o,2 ml Vetalar der Konzentration 1oo mg/ml betäubt und durch Genickschlag getötet. Wir eröffneten das Abdomen und präparierten die Harnblase frei, punktierten diese und gewannen somit Urin, der unverdünnt als Inhibitorlösung in die photometrische Untersuchung einging.

Der Urin eines normalen, nicht mit Trasylol behandelten Versuchstieres, weist keine Inhibitoraktivität auf. Eine Hemmwirkung des Urins auf Trypsin ist somit ausschließlich auf die Trasylolbehandlung zurückzuführen. Der Nachweis des Proteinase-Inhibitors im Urin bedeutet also, daß Trasylol resorbiert wurde, den Blutkreislauf passiert und somit auch einen vorhandenen Tumor erreicht hat.

Das Prinzip der photometrischen Bestimmung, die Herstellung der Lösungen, der Bestimmungsansatz und die Meßgrößen entsprechen den unter II.4. aufgeführten. Als Inhibitorlösung wird der unverdünnte Urin verwendet, sodaß kein Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Inhibitoraktivität im Urin berücksichtigt werden muß:

$$\frac{(\triangle E/min)_{Trypsin} - (\triangle E/min)_{Inhibitor}}{0{,}00332} \times 1o \quad \left[\text{ImU/ml Urin}\right]$$

II.6. Trasylol-Nachweis im Tumorgewebe

Die Methode des Trasylol-Nachweises im Tumorgewebe ist wiederum von H.U.BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse (3) vorgezeichnet.

Wir injizierten Trasylol i.p.. Die Versuchstiere wurden, wie beschrieben, betäubt, getötet und nach Freipräparieren des Herzens durch Blutentnahme aus den Herzkammern entblutet. Der Tumor wurde herauspräpariert und 1g blutleeres Tumorgewebe entnommen, das mit 1 ml Eiswasser und 2 ml 6%iger Perchlorsäure im Ultraturrax kalt homogenisiert wurde. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, 3 ml des Überstandes mit 5 M K_2Co_3-Lösung auf pH=4-7 eingestellt und nach 1-stündigem Stehen im Kühlschrank (o-4°C) die überstehende klare Lösung (Inhibitorprobe) vom ausgefallenen Kaliumperchlorat abdekantiert. Das Prinzip der photometrischen Bestimmung, die Herstellung der Lösungen, der Bestimmungsansatz und die Meßgrößen entsprechen der Versuchsanordnung unter II.4. . Als Inhibitorlösung werden o,1 ml der aus dem Tumorgewebe gewonnenen Inhibitorprobe eingesetzt. Die Berechnung ist ebenfalls analog II.4.:

$$\frac{(\triangle E/min)_{Trypsin} - (\triangle E/min)_{Inhibitor}}{o,oo332} \times 4o \left[\frac{ImU}{g\ Tumorgewebe} \right]$$

II.7. Bestimmung der Reptilase-Zeit

Die Bestimmung der Reptilase-Zeit erfolgte mit dem Reptilase-Reagenz der Firma Boehringer, Mannheim.

9 Teile durch Herzpunktion frisch entnommenes Blut wurden mit 1 Teil Natriumcitrat o,1 mol/l gemischt und anschließend 1o min bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung eingesetzt.

Prinzip (SORIA, 1969):

Im Citratplasma wird die Blutgerinnung verhindert, indem die als Cofaktoren bei vielen Gerinnungsreaktionen benötigten Ca^{2+}-Ionen durch eine Komplexbildung mit dem Citrat abgefangen werden. Das aus Schlangengift (Bothrops atrox) gewonnene proteolytische Enzym Reptilase überführt Fibrinogen in Fibrin durch Abspaltung des Fibrinopeptides A und leitet somit die Gerinnung ein. Reptilase wird im Gegensatz zu Thrombin von Heparin nicht beeinflußt. Eine Verlängerung der Reptilase-Zeit findet sich bei

1.) fibrinpolymerisationshemmenden Substanzen (Fibrinogen-Spaltprodukte)
2.) Hypofibrinogenämien
3.) Dysfibrinogenämien
4.) Hyperfibrinolysen

Bestimmungsansatz:

Das Reptilase-Reagenz wurde auf 37°C vortemperiert. Wir pipettierten in ein Eppendorf-Pipetten-Röhrchen o,3 ml Citratplasma, das 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde. Bei Zugabe von o,1 ml Reptilase-Reagenz wurde die Stoppuhr gestartet und mit einem vorher ausgeglühten Platinhäkchen der Zeitpunkt des Gerinnungseintrittes bestimmt, bei dem Fibrinfäden an dem Platinhäkchen festhafteten.

II.8. Bestimmung der Gerinnungszeit mit dem Fibrinogen Determination Set

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte mit dem Fibrinogen Determination Set der Firma Merz + Dade, Bern.

9 Teile durch Herzpunktion frisch entnommenes Blut wurden mit 1 Teil Natriumcitrat o,1 mol/l gemischt und 5 min bei 2ooo U/min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde im Verhältnis 1:2o mit Dade Owren's Veronalpuffer, pH 7,35, verdünnt und zur Bestimmung eingesetzt. Diese Verdünnung brachte die Gerinnungszeit in einen gut meßbaren Bereich.

Prinzip der Fibrinogenbestimmung (CLAUSS-Schnellmethode, 1957):

Bei Fibrinogenkonzentrationen zwischen 1o und 4o mg% ist nach Zugabe einer standardisierten Menge Thrombin die gemessene Gerinnungszeit proportional der Fibrinogenmenge.

Der Test ist eine Variation der Thrombinzeit, wobei das zu untersuchende Plasma in den optimalen Meßbereich (1o-4omg%) verdünnt wird. Die Bestimmung wird durch Heparin nicht beeinträchtigt. Auch Anti-Thrombin-Aktivität (Fibrinogen- und Fibrinsplitprodukte), wie sie bei Patienten mit Hyperfibrinolyse zu finden ist, wird zum größten Teil durch den im Test verwendeten Überschuß an Thrombin neutralisiert.

Bestimmungsansatz:

Wir inkubierten o,2 ml des mit Dade Owren's Veronalpuffer 1:2o verdünnten Plasmas 2 min bei 37°C. Wir gaben o,1 ml Thrombinlösung, die Raumtemperatur hatte, hinzu, starteten die Stoppuhr und bestimmten mit einem vorher ausgeglühten Platinhäkchen den Zeitpunkt des Gerinnungseintrittes, bei dem Fibrinfäden an dem Platinhäkchen haften blieben.

II. 9. Bestimmung der Thrombinzeit

Die Bestimmung der Thrombinzeit erfolgte mit dem Thrombin-Reagenz der Firma Boehringer, Mannheim.

9 Teile durch Herzpunktion frisch gewonnenes Blut wurden mit 1 Teil Natriumcitrat o,1 mol/l gemischt und anschließend 1o min bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung eingesetzt.

Prinzip (JÜRGENS, 1952):

Durch Zugabe des Enzyms Thrombin zum Plasma bildet sich aus Fibrinogen Fibrin. Damit entfällt in diesem Test die plasmaeigene Thrombinaktivierung und damit der Einfluß aller für die Prothrombinaktivierung erforderlichen Gerinnungsfaktoren. Die Thrombinzeit reagiert besonders empfindlich auf die Anwesenheit von Heparin und Fibrinogenspaltprodukten, weniger auf Schwankungen des Fibrinogens.

Bestimmungsansatz:

Das Thrombin-Reagenz wurde auf 37°C vortemperiert. Wir pipettierten in ein Eppendorf-Pipetten-Röhrchen o,2 ml Citratplasma, das 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde. Bei Zugabe von o,2 ml Thrombin-Reagenz wurde die Stoppuhr gestartet und mit einem vorher ausgeglühten Platinhakchen der Zeitpunkt des Gerinnungseintrittes bestimmt, bei dem Fibrinfäden an dem Häkchen hängen blieben.

II. 1o. Statistik

Aus den Einzelwerten der Versuchsreihen wurden zunachst die Mittelwerte $\bar{x}$ und die Standard-Streuung σ berechnet. Anschließend wurde, entsprechend dem T-Test nach STUDENT, aus Freiheitsgrad, Streuung und Mittelwerten der untersuchten Gruppen die biologische Signifikanz auf dem 95%igen Niveau (2-seitige Hypothese) überprüft. Bei unseren Versuchen lag ein Freiheitsgrad von 18 vor. Signifikanz ergab sich daher bei einem T-Wert $\geq$ 2,1.

III. ERGEBNISSE

III. 1. Antichymotrypsin (Angaben in ImU/ml_{Plasma})

Tabelle 1: Normalgruppe, 1o gesunde Ratten

N	Antichymotrypsin-Konzentration
1	78
2	85
3	88
4	8o
5	91
6	78
7	86
8	9o
9	89
1o	89

Tabelle 2: Tumorgruppe mit Tumorgewicht von o-5g

N	Antichymotrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	92	o,7
2	88	o,8
3	84	1,o
4	95	1,4
5	94	1,9
6	99	2,5
7	96	3,5
8	89	4,5
9	82	4,6
1o	71	4,8

Tabelle 3: Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 5-15g

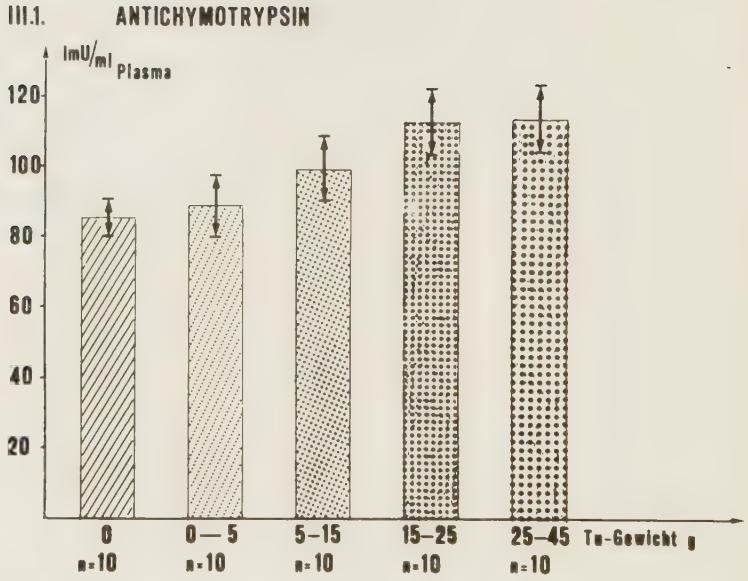
N	Antichymotrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	8o	7,3
2	98	8,o
3	1o2	8,2
4	1o8	8,7
5	99	8,7
6	1o3	11,6
7	1o4	11,9
8	1o6	13,o
9	92	14,8
1o	11o	15,o

Tabelle 4: Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 15-25g

N	Antichymotrypsin Konzentration	Tumorgewicht
1	1o3	17,o
2	112	17,6
3	97	18,o
4	129	18,o
5	114	18,8
6	112	19,1
7	112	19,3
8	1o9	21,o
9	122	22,2
1o	115	23,2

Tabelle 5: Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 25-45g

N	Antichymotrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	112	25,1
2	115	26,o
3	1o6	25,3
4	99	27,5
5	122	29,8
6	123	3o,o
7	118	33,5
8	123	33,5
9	117	35,7
1o	99	45,o



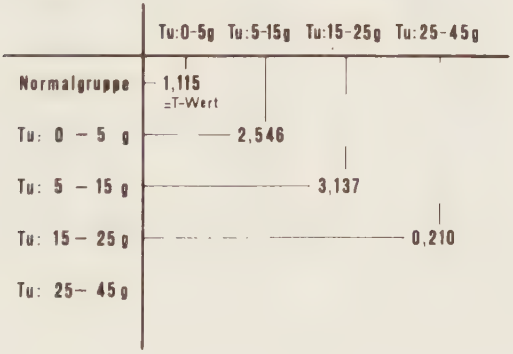
Die Abbildung III.1. zeigt den Mittelwert und die Standardstreuung der Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma der gesunden und der tumortragenden Tiere. Die einzelnen Gruppen bestanden aus je 1o 15o-2oog schweren Sprague-Dawley-Ratten.

Zu III.1.

ANTICHYMOTRYPSIN (ImU/ml Plasma)

Gruppen	$\bar{x}$	σ
Normalgruppe	85,40	4,99
Tu : 0 - 5 g	89,00	8,28
Tu : 5 - 15 g	98,33	8,91
Tu : 15 - 25 g	112,50	8,90
Tu : 25- 45 g	113,40	9,22

Signifikanz-Schema



Statistik zu III.1.: Der obere Teil der Abbildung gibt den Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardstreuung σ der Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma der Normal- und der Tumortiere wieder. Das darunter aufgeführte Signifikanz-Schema zeigt die T-Werte der unter III.1. aufgeführten Ergebnisse. Biologische Signifikanz liegt vor bei einem T-Wert $\geqq$ 2,1.

III.2.

TRASYLOL–NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Trasylol, i.p.	Blutentnahme nach...Std.	IU/ml Plasma
1	0		0
2	10 000 KIE	1/2	0,139
3	"	1	0,223
4	"	2	0,192
5	"	3	0,119
6	"	5	0,153
7	"	7	0,076

1o.ooo KIE des Proteinasen-Inhibitors Trasylol wurden i.p. injiziert. Die Tiere wurden nach 1/2, 1, 2, 3, 5 und 7 Stunden getötet und die Inhibitoraktivität im Plasma bestimmt. Ein unbehandeltes, gesundes Tier diente als Vergleich.

III.3.

TRASYLOL-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Trasylol, i.p.	Blutentnahme nach ... Std.	IU/ml Plasma
1	0		0
2	20 000 KIE	1/4	0,289
3	"	1/2	0,328
4	"	1	0,283
5	"	2	0,275
6	"	3	0,145
7	"	4	0,089
8	"	5	0,116
9	"	7	0,046

20.000 KIE Trasylol wurden i.p. injiziert. Die Tiere wurden nach 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Stunden getötet und die Inhibitoraktivität im Plasma bestimmt. Ein unbehandeltes, gesundes Tier diente als Vergleich.

III.4.

TRASYLOL-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Trasylol, i.p.	Blutentnahme nach... Std.	IU/ml Plasma
1	0		0
2	80 000 KIE	1/4	0,322
3	"	1/2	0,382
4	"	3/4	0,474
5	"	1	0,528
6	"	2	0,457
7	"	3	0,234
8	"	4	0,286
9	"	5	0,229
10	"	7	0,084

Wir injizierten 80.000 KIE Trasylol i.p. Die Tiere wurden nach 1/4, 1/2, 3/4, 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Stunden getötet und die Inhibitoraktivität im Plasma bestimmt. Ein unbehandeltes, gesundes Tier diente als Vergleich.

III.5.

TRASYLOL-NACHWEIS IM URIN

Tier	Trasylol i.p.	Urinentnahme nach ... Std.	IU/ml Urin
1	0		0
2	0		0
3	0		0
4	20 000 KIE	1/4	0
5	"	1/2	0
6	"	1	0
7	"	1 1/2	0
8	"	2	0
9	80 000 KIE	1/4	0
10	"	1/2	0,113
11	"	1	0,118
12	"	1 1/2	0,118
13	"	2	0,118

Wir injizierten 2o.ooo und 8o.ooo KIE Trasylol i.p. Wir töteten die Tiere nach 1/4, 1/2, 1, 1 1/2 und 2 Stunden und gewannen Urin durch Blasenpunktion. Die Inhibitoraktivität im Urin wurde bestimmt und mit der von 3 unbehandelten, gesunden Normaltieren verglichen.

III.6.

TRASYLOL-NACHWEIS IM TUMOR

Tier	Trasylol, i.p.	Gewebsentnahme nach ... Std.	IU/g Tu-Gewebe
1	0		0
2	20 000 KIE	1	0,031
3	80 000 KIE	3/4	0,086
4	"	1 1/4	0,167

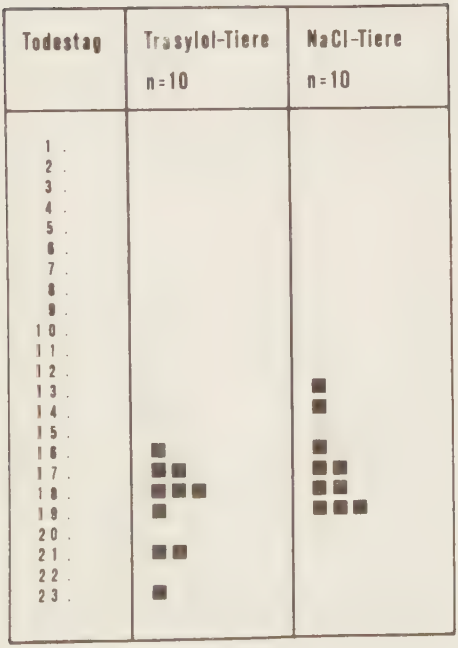
Wir injizierten 2o.ooo und 8o.ooo KIE Trasylol i.p. Die Tiere wurden nach 6o bzw. 45 und 75 Minuten getötet, entblutet, und die Inhibitoraktivität im Tumorgewebe bestimmt. Ein unbehandeltes Tier diente als Vergleich.

III.7.

TRASYLOL-THERAPIE

80 000 KIE, i.p.

1 Std. vor Tumorüberimpfung



Trasylol-Therapie zur Ermittlung der Angeh- und Überlebensrate:

Wir injizierten 80.000 KIE Trasylol i.p. 1 Stunde vor der Tumorüberimpfung. Zum Zeitpunkt der Überimpfung war, wie unter III.4. aufgeführt, das Maximum der Proteinasen-Inhibitor-Konzentration im Plasma

(528 ImU/ml_{Plasma}) vorhanden. Den Vergleichstieren wurden unter gleichen Bedingungen 4 ml physiologische NaCl-Lösung injiziert, die mengenmäßig 80.000 KIE Trasylol entsprechen. Der Todestag der Tiere wurde registriert. Die Zählung begann mit dem Tag nach der Überimpfung.

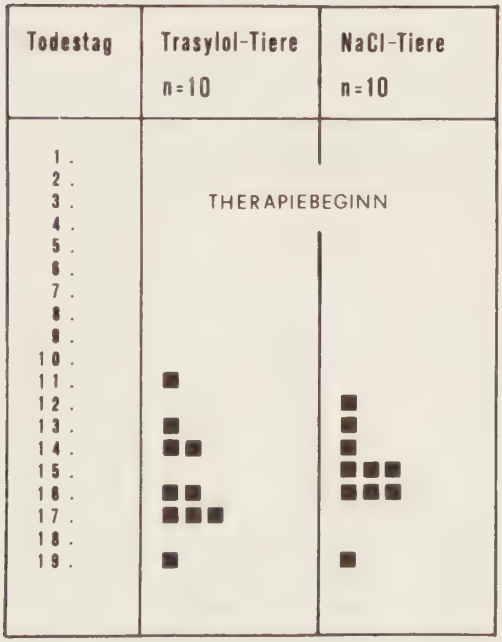
Ergebnis:

	Trasylol-Tiere	NaCl-Tiere
Angehrate	100 %	100 %
mittlerer Todestag	18,8	17,0

III.8.

TRASYLOL-THERAPIE

10 000 KIE, i.p., täglich



Trasylol-Therapie zur Ermittlung der Uberlebensrate:

Wir begannen mit der Proteinasen-Inhibitor-Therapie 3 Tage nach der Tumorüberimpfung und injizierten 1 x täglich 1o.ooo KIE Trasylol i.p. Den Vergleichstieren wurden unter gleichen Bedingungen o,5 ml physiologische

NaCl-Lösung injiziert, die mengenmäßig 10.000 KIE Trasylol entsprechen. Der Todestag der Tiere wurde registriert. Die Zählung begann mit dem Tage nach der Überimpfung.

Ergebnis:

Der mittlere Todestag der Trasylol-Tiere betragt 15,4 Tage, der der NaCl-Tiere 15,1 Tage.

III.9.

TRASYLOL-THERAPIE

20 000 KIE i.p., täglich

Todestag	Trasylol-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.	THERAPIEBEGINN	
4.		
5.		
6.		
7		
8.		
9.		
10		
11		
12.		
13.	■	■
14.	■■	■■■■
15.	■■■■	■
16.	■	■■
17.	■■	■■

Trasylol-Therapie zur Ermittlung der Überlebensrate:

Wir begannen mit der Proteinasen-Inhibitor-Therapie 3 Tage nach der Tumorüberimpfung und injizierten 1 x täglich 20.000 KIE Trasylol i.p. Den Vergleichstieren wurde unter gleichen Bedingungen das adäquate Volumen an physiologischer NaCl-Lösung, 1 ml, injiziert.

Der Todestag der Tiere wurde registriert.
Die Zählung begann mit dem Tage nach der Überimpfung.

Ergebnis:

Der mittlere Todestag der Trasylol-Tiere beträgt 15,1 Tage, der der NaCl-Tiere 15,o Tage.

III.10.

TRASYLOL-THERAPIE

80 000 KIE, i.p., täglich

Todestag	Trasylol-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.	THERAPIEBEGINN	
4.		
5.		
6.		
7.		■
8.		
9.		
10.	■	■
11.		■
12.		■
13.	■■■	■
14.		
15.	■■■■■■	■■
16.		■■■

Trasylol-Therapie zur Ermittlung der Überlebensrate:

Wir begannen mit der Proteinasen-Inhibitor-Therapie 3 Tage nach der Tumorüberimpfung und injizierten 1 x taglich 8o.ooo KIE Trasylol i.p.

Den Vergleichstieren wurde unter gleichen Bedingungen das adäquate Volumen an physiologischer NaCl-Lösung, 4 ml, injiziert. Der Todestag der Tiere wurde registriert. Die Zählung begann mit dem Tage nach der Überimpfung.

Ergebis:

Der mittlere Todestag der Trasylol-Tiere beträgt 13,9 Tage, der der NaCl-Tiere 13,1 Tage.

III.11. Reptilase-Zeit (Angaben in sec)

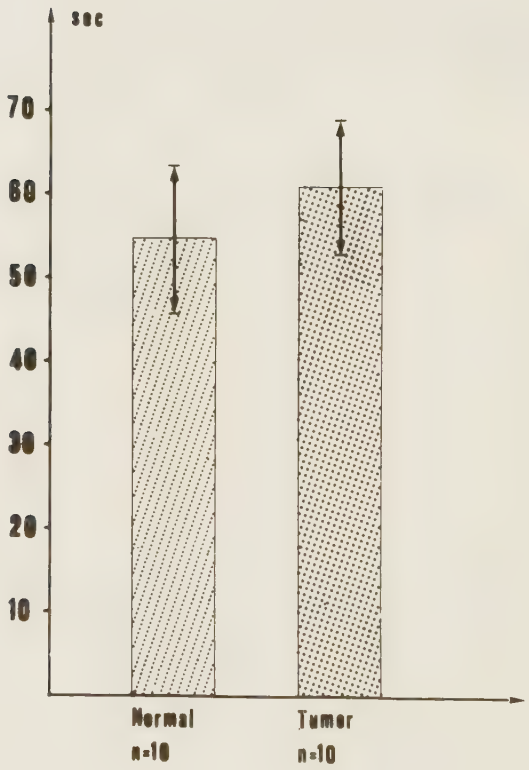
Tabelle 6 : Normalgruppe, 1o gesunde Ratten

N	Reptilase-Zeit
1	42
2	6o
3	54
4	53
5	45
6	61
7	72
8	47
9	55
1o	57

Tabelle 7 : Tumorgruppe mit Tumorgewicht von o-2o g

N	Reptilase-Zeit	Tumorgewicht
1	58	o,4
2	69	o,5
3	62	o,9
4	8o	5,o
5	56	9,o
6	57	12,o
7	56	12,5
8	55	15,5
9	56	15,5
1o	58	18,5

III.11. REPTILASEZEIT



Die Abbildung III.11. zeigt den Mittelwert und die Standardstreuung der Reptilase-Zeit der Normal- und der Tumorgruppe. Die beiden Gruppen bestanden aus 10 150-200 g schweren Spraque-Dawley-Ratten.

Zu III.11.

REPTILASEZEIT (sec)

Gruppen	$\bar{x}$	σ
Normalgruppe	54,80	8,75
Tumorgruppe	60,70	7,95

Signifikanz-Schema

Statistik zu III.11. :

Der obere Teil der Abbildung gibt den Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardstreuung σ der Reptilase-Zeit von Normal- und Tumortieren wieder. Das darunter aufgeführte Signifikanz-Schema zeigt den T-Wert der unter III. 11. aufgeführten Ergebnisse. Biologische Signifikanz liegt vor bei einem T-Wert $\geq$ 2,1 .

III.12. Bestimmung der Gerinnungszeit mit dem Fibrinogen-Determination-Set der Firma Merz + Dade (Angaben in sec) (CLAUSS-Methode)

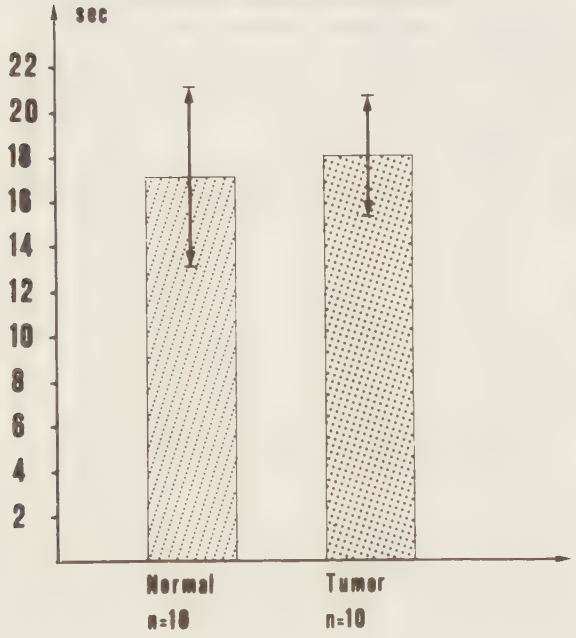
Tabelle 8 : Normalgruppe, 1o gesunde Ratten

N	Gerinnungszeit
1	14
2	15
3	24
4	13
5	15
6	14
7	18
8	24
9	18
1o	16

Tabelle 9 : Tumorgruppe mit Tumorgewicht o-2o g

N	Gerinnungszeit	Tumorgewicht
1	15	o,4
2	19	o,5
3	2o	o,9
4	13	5,o
5	18	9,o
6	2o	12,o
7	21	12,5
8	16	15,5
9	17	15,5
1o	21	18,5

III.12. GERINNUNGSZEIT
(FIBRINOGEN-BESTIMMUNGSSATZ)



Die Abbildung III.12. zeigt den Mittelwert und die Standardstreuung der mit dem Fibrinogenbestimmungssatz der Firma Merz + Dade ermittelten Gerinnungszeit von Normal- und Tumortieren. Die beiden Gruppen bestanden aus je 1o 15o-2oo g schweren Spraque-Dawley-Ratten.

Zu III.12.

GERINNUNGSZEIT (sec)
(FIBRINOGEN-BESTIMMUNGSSATZ)

Gruppen	$\bar{x}$	σ
Normalgruppe	17,10	3,98
Tumorgruppe	18,00	2,70

Signifikanz–Schema

Statistik zu III.12. :

Der obere Teil der Abbildung gibt den Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardstreuung σ der mit dem Fibrinogen-Bestimmungssatz der Firma Merz + Dade ermittelten Gerinnungszeit von Normal- und Tumortieren wieder. Das darunter aufgeführte Signifikanz-Schema zeigt den T-Wert der unter III.12. aufgeführten Ergebnisse. Biologische Signifikanz liegt vor bei einem T-Wert $\geq$ 2,1.

III.13.

HEPARIN-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Heparin (Liquemin 5000), i.p.	Blutentnahme nach... Std.	Thrombinzeit in sec
1	0		25
2	0		36
3	0		31
4	1000 USP-E.	1	▲
5	"	5	▲
6	"	9	▲
7	"	20	40
8	2000 USP-E.	1	▲
9	"	5	▲
10	"	9	▲

▲ = kein Gerinnungseintritt in den ersten 2 Minuten

Der Nachweis der Antiprotease Heparin im Plasma erfolgte durch die Bestimmung der Thrombinzeit, da Reptilase im Gegensatz zu Thrombin von Heparin nicht beeinflußt wird. Wir injizierten 1ooo bzw. 2ooo USP-E. Heparin (Liquemin 5ooo) i.p. Die Tiere wurden nach 1, 5, 9 und 2o Stunden bzw. nach 1, 5 und 9 Stunden getötet, und die Thrombinzeit bestimmt. 3 unbehandelte gesunde Tiere dienten als Vergleich.

III.14.

HEPARIN-THERAPIE

250 USP-E. Liquemin 5000, i.p., täglich

Todestag	Heparin-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.	THERAPIEBEGINN	
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.	■	
10.	■■	■■
11.		■■
12.	■	■■■
13.	■■■■■	■■■
14.		
15.		
16.		
17.	■	

Heparin-Therapie zur Ermittlung der Überlebensrate:

Wir begannen mit der Antiproteasen-Therapie 3 Tage nach der Tumorüberimpfung und injizierten 1 x täglich 250 USP-E. Liquemin 5000 i.p. Den Vergleichstieren wurde unter gleichen Bedingungen das adäquate Volumen an physiologischer NaCl-Lösung, 1 ml, injiziert. Der Todestag der Tiere wurde registriert. Die Zählung begann mit dem Tag nach der Überimpfung.

Ergebnis: Der mittlere Todestag der Heparin-Tiere beträgt 12,3 Tage, der der NaCl-Tiere 11,7 Tage.

III.15.

HEPARIN-THERAPIE

1000 USP-E. Liquemin 5000, i.p., täglich

Todestag	Heparin-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1		
2		
3.	THERAPIEBEGINN	
4		
5	■	
6.	■■	
7.	■	
8.	■	
9	■■■	
10.	■■	
11.		
12.		■■■■
13.		■■■
14.		
15.		
16		■■■

Heparin-Therapie zur Ermittlung der Überlebensrate:
Wir begannen mit der Antiproteasen-Therapie 3 Tage nach der Tumorüberimpfung und injizierten 1 x taglich 1000 USP-E. Liquemin 5000 i.p. Den Vergleichstieren wurde unter gleichen Bedingungen das adaquate Volumen an physiologischer NaCl-Lösung, 1 ml, injiziert. Der Todestag der Tiere wurde registriert. Die Zählung begann mit dem Tage nach der Überimpfung.

Ergebnis :

Der mittlere Todestag der Heparin-Tiere betragt 7,9 Tage, der der NaCl-Tiere 13,5 Tage.

IV. DISKUSSION

IV.1. Diskussion der diagnostischen Ergebnisse

Man verfügt heute über eine Vielzahl an Publikationen, die über eine erhöhte proteolytische Aktivität transformierter Zellen und Tumorzellen berichten.

Bereits 1925 zeigte Fischer, daß Explantate von virusbedingten Hühnersarkomen die Fähigkeit besitzen, eine Auflösung von Gerinnseln zu bewirken (17). Eine erhöhte fibrinolytische Aktivitat konnte bei Vögel- und Säugetierfibroblasten festgestellt werden, die durch onkogene Viren und chemische Karzinogene transformiert wurden, sowie in Primärkulturen chemisch induzierter Karzinome der Rattenleber und Rattenbrustdrüse; weiterhin in Primärkulturen chemisch und virusbedingter Mäusebrustdrüsenkarzinome und Mäusehauttumoren (34, 54). KIFKIN und Mitarbeiter zeigten, daß eine ähnlich erhöhte fibrinolytische Aktivität auch bei menschlichen Neoplasmen vorhanden ist. Sie untersuchten ein Osteosarkom, ein Mesotheliom und ein malignes Melanom(37).

Die erhöhte proteolytische Aktivität transformierter und Tumorzellen beschränkt sich nicht nur auf die Fibrinolyse und damit auf die Aktivierung des Plasminogens zum Plasmin durch verstärkte Produktion des Plasminogen-Aktivators, sondern beinhaltet auch die verstärkte Ausschüttung lysosomaler Enzyme. SYLVEN (5o) berichtete über eine erhöhte katheptische Aktivität bei schnell wachsenden Zellen, BOSMANN (36) über erhöhte Enzymaktivität saurer und neutraler Proteasen und Glykosidasen in Extrakten transformierter Fibroblasten. Andere Autoren zeigten einen Anstieg der Kollagenase beim Aszites- Karzinom, der Neuraminidase bei transformierten Fibroblasten, der Kathepsin-, ß-Glucuronidase- und saure Phosphatase-Konzentration beim Hautkarzinom der Maus (36, 44).

Viele Autoren halten einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen gesteigerter proteolytischer Aktivität und den grundsätzlichen Eigenschaften von transformierten bzw. Tumorzellen für äußerst wahrscheinlich:

BURGER und FOX sehen den Proteaseneinfluß darin, daß eine Neuordnung der molekularen Oberflächenarchitektur erfolgt. Die Zelle wird durch die Oberflächenänderung agglutinationsfähig, indem bisher verhüllte Agglutinin-Bindungsstellen freigelegt, und die Zellteilung angeregt wird (9, 18).

STROUD verweist ebenfalls auf eine Änderung der Oberflächenstruktur der Zellen, für die er das Fibrinolysin verantwortlich macht. Fibrinolysin entfernt proteingebundene Antigene von der Zelloberfläche und verhindert somit die Identifizierung durch die Nachbarzellen und das Immunsystem. Die Kontaktinhibition ist aufgehoben, die Zelle beginnt unkontrolliert zu wachsen (49).

LATNER macht die proteolytischen Enzyme maligner Zellen für ein Abblocken der immunologischen Überwachung verantwortlich. Die Proteasen spalten einen auf der Zellwand von T-Lymphozyten befindlichen spezifischen Antikörper, der gegen die maligne Zelle gerichtet ist, ab, und entziehen die Zelle somit der immunologischen Kontrolle (3o).

Die natürlich vorkommenden Protease-Inhibitoren können durch die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes die enzymatische Aktivität ihrer spezifischen Proteasen einschränken bzw. unterdrücken. HARRIS konnte nachweisen, daß das quantitativ am stärksten vertretene Alpha$_1$-Antitrypsin (AAT) bei Patienten mit inoperablem Lungen-Karzinom im Serum signifikant erhöht ist (25). LATNER zeigte, daß parallel zur ansteigenden malignen Entwicklung des Cervix-Karzinoms die AAT-Plasma-Konzentration zunimmt (31). Er vermutet, daß die Erhöhung der Antiproteasenkonzentration eine direkte Reaktion des Organismus auf den Krebs darstellt.

Wir überimpften das Walker-Karzinom 256 auf 15o-2oo g schwere Spraque-Dawley Ratten und bestimmten photometrisch

die Antichymotrypsinkonzentration im Plasma. Die Mittelwerte der einzelnen Tumorgruppen sind im Vergleich mit dem Mittelwert der Normalgruppe erhöht und nehmen mit steigendem Tumorgewicht zu.
Biologische Signifikanz liegt vor beim Vergleich der Tumorgruppe o-5 g mit der Tumorgruppe 5-15g und beim Vergleich der Tumorgruppe 5-15 g mit der Tumorgruppe 15-25 g. Dieses Ergebnis entspricht den von HARRIS und LATNER erarbeiteten Befunden, daß maligne Tumoren mit einer gesteigerten Antiproteasen-Aktivität im Plasma einhergehen (25, 31). Eine parallel laufende Arbeit kommt jedoch zu einem vollkommen gegensätzlichen Ergebnis. Unter Verwendung derselben Ratten wurde die Antiproteasenaktivität im Plasma am Parameter Alpha$_1$-Antitrypsin gemessen. Die Mittelwerte der Tumorengruppen sind im Vergleich mit dem Mittelwert der Normalgruppe erniedrigt und nehmen mit steigendem Tumorgewicht ab. Biologische Signifikanz liegt vor beim Vergleich der Normalgruppe mit der Tumorgruppe o-5 g. AAT ist die quantitativ weitaus bedeutendere Antiprotease und muß deshalb verstärkt gewertet werden. Folgende Erklärungen könnten für dieses konträre Ergebnis herangezogen werden:

1. Die Theorie, daß der Organismus malignen Tumoren durch eine Erhöhung der Antiproteasen Widerstand entgegenzusetzen versucht ist falsch.

   Dem gegenüber steht die Tatsache, daß Frauen, bei denen ein Gebärmutterhalsabstrich das Vorhandensein eines Cervix-Karzinoms möglich erscheinen läßt, und die anschließende histologische Untersuchung diesen Verdacht bestätigt, bereits eine signifikant erhöhte AAT-Plasmakonzentration aufweisen. Mit zunehmender maligner Entwicklung wächst auch die AAT-Konzentration, was die oben aufgeführte Theorie in den Bereich des Wahrscheinlichen rückt.

2. Die Antwort des Organismus richtet sich nach der Art des vorhandenen Tumors und somit nach der für ihn spezifisch vermehrten proteolytischen Aktivität.

   SNYDER und ASHWELL (47) untersuchten durch maligne Tumoren bedingte quantitative Änderungen bei einer Anzahl spezifischer Glykoproteine.

Die AAT-Serumkonzentration wird von ihnen mit 63o mg% angegeben, die Normalkonzentration mit 21o mg%. HARRIS (25) gibt die Normalkonzentration mit 31o mg% an. Der AAT-Serumgehalt bei Patienten mit inoperablem und histologisch erwiesenem Lungen-Karzinom schwankt je nach Zelltyp zwischen 434 und 531 mg%. LATNER (31) ermittelte eine Normalkonzentration im Plasma von 24o mg%, bei Frauen mit Verdacht auf ein Cervix-Karzinom von 345 mg%.

Der menschliche Organismus antwortet auf die aufgeführten malignen Tumoren stets mit einer mehr oder weniger starken Erhöhung der AAT-Serumkonzentration. Das für die Ratte spezifische Walker-Karzinom 256 wird nicht in dieser Weise beantwortet. Die Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma ist erhöht. Eine erhöhte Aktivität anderer Antiproteasen als Antwort auf den malignen Tumor ist nicht auszuschließen, da nur die beiden Parameter Antichymotrypsin und Alpha$_1$- Antitrypsin untersucht wurden.

3. Eine weitere mögliche Erklarung für eine erhöhte Antiproteasenaktivitat im Gefolge einer malignen Erkrankung liegt in der Annahme, daß die Erhöhung der AAT-Plasmakonzentration eine Sekundärwirkung des Tumors darstellt, daß sie Ausdruck von Lebermetastasen ist. Der durch die Lebermetastasen entstehende Druck auf die Gallengange könnte diese verlegen, die Sekretion von Gallenflüssigkeit verhindern und eine Cholestase bewirken. Der Rückstau der Gallenflüssigkeit drängt diese und damit die in ihr enthaltenen Antiproteasen, die über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden, ins Gefäßsystem, wo es zu einem meßbaren Anstieg der Protease-Inhibitoren kommt.

Das Walker-Karzinom 256 der Ratte ist ein maligner destruierend wachsender Tumor, der aber nicht metastasiert. Demzufolge könnte die Nichterhöhung der AAT-Plasmakonzentration aus dieser Theorie abgeleitet werden. Das signifikante Absinken der AAT-Plasmakonzentration der tumortragenden Tiere bleibt jedoch ebenso ungeklärt wie

der gleichzeitige Anstieg der Antichymotrypsin-Aktivität im Plasma. Einen weiteren Befund, der diese Theorie unglaubwürdig erscheinen läßt, lieferte LATNER mit seinen Untersuchungen über die Antiproteasenaktivität im Plasma in Abhängigkeit vom Stadium des Cervix-Karzinoms (31). Ein klinisch noch nicht diagnostizierbares Cervix-Karzinom bewirkt bereits einen signifikanten Anstieg der AAT-Plasmakonzentration. Eine Metastasierung in diesem Frühstadium kann ausgeschlossen werden.

IV. 2. Diskussion der therapeutischen Ergebnisse

Indem wir der Theorie, daß der Organismus einer malignen Erkrankung durch Erhöhung der Antiproteasen zu begegnen sucht, einräumen, im Bereich des Wahrscheinlichen zu liegen, stellt sich nach Kenntnis der diagnostischen Ergebnisse die Frage, ob eine Therapie mit Antiproteasen beim Walker-Karzinom 256 überhaupt angebracht ist. Wir wissen, daß der menschliche Organismus in den angeführten Beispielen stets mit einer Erhöhung der AAT-Plasmakonzentration auf eine maligne Erkrankung antwortet. Der Organismus der Ratte reagiert nicht in dieser Weise. Die Frage nach dem Sinn einer Antiproteasen-Therapie, die vom Körper vorgezeichnet erscheint, beantwortet sich durch die gemessene Erhöhung der Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma und durch die Möglichkeit, daß andere, von uns nicht erfaßte Antiproteasen-Konzentrationen als Reaktion auf den Tumor erhöht sein könnten. Unumstritten ist, wie die zu Beginn der Diskussion angeführten Beispiele zeigen, daß maligne Tumoren eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweisen. Daraus ergibt sich die Rechtfertigung für eine Antiproteasentherapie, über deren Erfolg eine Vielzahl von Autoren berichten:

SCHNEBLI und BURGER weisen auf die wachstumshemmende Wirkung der Protease-Inhibitoren TLCK, TPCK, TAME, Ovomucoid und

Trasylol bei transformierten Py3T3, SV3T3, 3T12 und Py BHK-Zellen hin (4o).

GOLDBERG konnte die durch pflanzliche Lectine sichtbar gemachte erhöhte Agglutinationsfähigkeit transformierter SV3T3 und Py3T3 Zellen durch TLCK, TPCK und Ovomucoid vermindern (21).

LATNER überschichtete Virus-transformierte Hamsternierenzellen mit einem Mäusenierenexplantat. Er konnte die maligne Invasion des Explantats durch Anwendung des Proteinase-Inhibitors Trasylol signifikant eindämmen (29).

GOLDBERG hemmte die durch Plasminwirkung induzierte Caseinolyse mit TLCK, TPCK, Sojabohnen-Trypsininhibitor und Rinderpankreas-Trypsininhibitor (2o).

In vivo-Versuche bestätigen die Antitumor-Aktivität von Protease-Inhibitoren:

TROLL konnte die Tumorgenese in der Haut von Mäusen mit TLCK, TPCK, und TAME hemmen (53).

HOZUMI erreichte einen ähnlichen Therapieerfolg unter Verwendung des Protease-Inhibitors Leupeptin (27).

LATNER erzeugte ein Fibrosarkom bei Hamstern, untersuchte die Wirkung des Trasylols auf den Tumor an den Parametern Tumorgewicht, maligne Invasion und Tumornekrose. Trasylol konnte das Tumorgewicht verkleinern, die maligne Invasion vollständig unterbinden und Tumoren total nekrotisieren. Bei Anwendung des Trasylols gegen ein Adenokarzinom bei Mäusen, konnte die Überlebenszeit der therapierten Tiere signifikant verlängert werden (3o).

Wir verwendeten den polyvalenten Proteinasen-Inhibitor Aprotinin (Trasylol, Firma Bayer, Leverkusen), um eine möglichst große Anzahl von Proteinasen zu erfassen. Wir führten Versuche zur Ermittlung der Angeh- und Überlebensrate durch.

Trasylol wurde jeweils i.p. injiziert, die Konzentrationen betrugen 1o.ooo, 2o.ooo und 8o.ooo KIE. 8o.ooo KIE Trasylol entsprechen mengenmäßig 4 ml physiologischer NaCl-Lösung, womit die maximale quantitative Belastbarkeit der Ratten erreicht schien.

8o.ooo KIE Trasylol wurden zur Ermittlung der Angehrate und Überlebensrate 1 Stunde vor der Tumorüberimpfung injiziert. Zum Zeitpunkt der Überimpfung war dann, wie der Nachweisversuch für diese Konzentration zeigt, das Maximum der Proteinasen-Inhibitor-Konzentration im Plasma vorhanden. Die Angehrate des Tumors konnte nicht beeinflußt werden, sie beträgt bei den therapierten Tieren und den Vergleichstieren jeweils 1oo%. Der mittlere Todestag der beiden Gruppen differiert um 1,8 Tage zugunsten der Trasylol-Tiere. Dieses Ergebnis wurde nicht statistisch ausgewertet, da bereits die graphische Darstellung des Versuches keine Signifikanz erwarten läßt.

Zur Ermittlung der Überlebensrate führten wir 3 weitere Versuche durch, bei denen 1o.ooo bzw. 2o.ooo und 8o.ooo KIE Trasylol 1 x täglich i.p. injiziert wurden. Der mittlere Todestag der beiden Gruppen differiert beim ersten Versuch um o,3 Tage, beim zweiten um o,1 Tage und beim dritten um o,8 Tage zugunsten der mit Trasylol therapierten Tiere. Auch hier erfolgte keine statistische Auswertung, da die graphische Darstellung der Versuche solches wiederum erübrigte. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß Trasylol den vorliegenden Tumor gemessen an dem Parameter Angehrate nicht beeinflußt. Die Überlebensrate der therapierten Tiere wird durch die Trasylol-Konzentrationen 1o.ooo und 2o.ooo KIE minimal verlangert, durch die Konzentration 8o.ooo KIE deutlich positiver beeinflußt.

Eine abschließende Wertung über die Anwendung des Proteinasen-Inhibitors Trasylol beim Walker-Karzinom 256 der Ratte hat folgendes Aussehen:

Die Trasylol-Therapie gegen das Walker-Karzinom 256 erbringt keine derart eindeutigen Ergebnisse, wie sie

LATNER bei der Anwendung gegen ein Adenokarzinom der Maus und gegen ein Fibrosarkom beim Hamster verzeichnen konnte (3o).

Verschiedene Erklärungen könnten dafür herangezogen werden:

1. Die Theorie, daß Antiproteasen maligne Tumoren positiv beeinflussen, ist falsch. Eine Vielzahl von Autoren hat jedoch, wie oben angeführt, eindeutig unter Beweis gestellt, daß Antiproteasen eine wirksame Waffe gegen die Malignität darstellen können.

2. Wesentlich wahrscheinlicher für das Versagen unserer Therapie ist, daß unsere Versuchs-Variablen nicht ausreichend waren. Hier ist zuerst die Applikationsart zu nennen. Wir injizierten Trasylol i.p., LATNER injizierte Trasylol subkutan, i.p. und direkt in den Tumor, was sich als effektivste Maßnahme erwies und sämtliche Tumoren total nekrotisierte (3o).

3. Die Dosierung war nicht ausreichend. Unsere Ergebnisse zeigen, daß das Walker-Karzinom 256 bei i.p.-Injektion von Trasylol auf höhere Konzentrationen besser anzusprechen scheint als auf niedrigere. LATNER konnte durch i.p.-Injektion von nur 1o.ooo KIE Trasylol zur Bekämpfung eines Fibrosarkoms beim Hamster das Tumorgewicht zwar nicht verkleinern, die maligne Invasion aber vollständig unterbinden und die Tumornekrosen signifikant erhöhen (3o). Eine Verbesserung unseres Versuchsergebnisses durch Erhöhung der Dosierung erscheint möglich. Die Grenzen der Dosierung sind jedoch durch die Volumenbelastung des Versuchstieres abgesteckt.

4. Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Injektionen waren zu groß.
In diesem Punkt besteht ein wesentlicher Unterschied zu LATNERS Arbeit. LATNER konnte Trasylol 2 x tagl. applizieren, wir injizierten nur 1 x täglich. Für einen zu groß gewählten zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen

Injektionen sprechen auch die Trasylol-Nachweisversuche im Plasma. Die maximale Inhibitor-Aktivität im Plasma wird bei i.p.-Injektion von 1o.ooo KIE Trasylol nach 1 Stunde mit o,223 IU/ml Plasma erreicht. Nach 7 Stunden ist die Inhibitoraktivität bereits auf o,o76 IU/ml Plasma abgesunken. Ähnliche Werte finden sich nach Applikation von 2o.ooo bzw.8o.ooo KIE. Nach i.p.-Injektion von 2o.ooo KIE liegt das Maximum der Inhibitor-Aktivität bei einer 1/2 Stunde mit o,328 IU/ml Plasma. Nach 7 Stunden sind noch o,o46 IU/ml Plasma vorhanden. Nach i.p.-Injektion von 8o.ooo KIE ist das Maximum mit o,528 IU/ml Plasma nach 1 Stunde erreicht. Nach 7 Stunden ist diese Konzentration auf o,o84 IU/ml Plasma gefallen. Der rapide Abfall der Plasmakonzentration liegt in der schnellen Ausscheidung des Trasylols über die Niere begründet. BERGMAYER (3) macht dazu folgende Angaben:
Nach i.v.-Injektion von 5.4oo KIE Trasylol bei Ratten werden nach 1 Stunde 66 % und nach 4 Stunden 87 % der injizierten Inhibitormenge in Serum plus Leber plus Nieren wiedergefunden, 93 % davon in den Nieren.

5. Eine Nicht-Resorption des Trasylols nach i.p.-Injektion als Erklärung für das Versagen der Therapie scheidet aus, wie die Nachweisversuche des Trasylols im Plasma, im Urin und im Tumorgewebe zeigen.

Die Blutgerinnung ist bei den tumorkranken Ratten verzögert. Wir bestimmten die Gerinnungszeit nach der CLAUSS-Methode mit einem Fibrinogen-Bestimmungssatz und nach dem Prinzip von SORIA über die Reptilase-Zeit. Beide Parameter zeigen einen erhöhten Mittelwert für die Tumorgruppe. Dasselbe Ergebnis wurde in einer Parallelarbeit durch die Bestimmung der Thrombinzeit nach dem Prinzip von JÜRGENS, 1952, ermittelt. Die Verlängerung der Gerinnungszeit bei den tumorkranken Ratten ist auf eine Abnahme des Fibrinogens und/oder auf eine verstärkte Produktion von Antiproteasen, d.h. von Antithrombinen, zurückzuführen.

Hier deutet sich wiederum die Möglichkeit an, daß der Organismus auf eine maligne Erkrankung mit einer Erhöhung von Antiproteasen reagiert. Die Fibrinogenkonzentration wurde bei Tumorpatienten in den meisten Fällen als normal oder leicht erhöht ermittelt.
Heparin wirkt als Antiprotease, indem es sich mit dem plasmatischen Antithrombin III verbindet. Diese Verbindung beschleunigt die Hemmung der Umwandlung des Prothrombins zum Thrombin. Daraus resultiert eine verminderte Umwandlung des Fibrinogens zum Fibrin und somit eine verlangerte Gerinnungszeit. Die Wirkung des Heparins bei der Ratte wurde durch die Bestimmung der Thrombinzeit sichergestellt. Die Heparin-Therapie zur Ermittlung der Überlebenszeit erbrachte bei täglicher i.p. Injektion von 1 x 250 USP-E. Liquemin 5000 einen mittleren Todestag der Heparin-Tiere von 12,3 Tagen. Die nicht therapierten Vergleichstiere wiesen einen mittleren Todestag von 11,7 Tagen auf. Das Ergebnis wurde nicht statistisch ausgewertet. Die auf 1000 USP-E. erhöhte Dosis erwies sich unter den gleichen Versuchsbedingungen als toxisch. Der mittlere Todestag der Heparin-Tiere betrug bei diesem Versuch 7,9 Tage, der der NaCl-Tiere 13,5 Tage.
Die Antiproteasen-Therapie mit Heparin gegen das Walkerkarzinom 256 der Ratte liefert bei Verwendung einer nicht toxischen Dosis ein ähnliches Ergebnis wie die Therapie mit dem Proteinasen-Inhibitor Trasylol:

Die Überlebenszeit der therapierten Tiere konnte leicht positiv beeinflußt werden. Eindeutige Ergebnisse, wie sie LATNER zu verzeichnen hatte, blieben auch hier aus.

Biochemische Tumordiagnostik und -therapie
Rainer K u h n

"Experimentelle Untersuchungen zur Rolle der Antiproteasen beim Walker-Karzinom 256 der Ratte"

Geboren am: 31.August 1951 in Eisenach/Thüringen
Vorbildung: Grundschule Herleshausen/Hessen und Gerhart Hauptmann-Schule, Gymnasium in Sontra/Hessen
Reifeprüfung am: 16.Juni 197o in Sontra
Studiengang: Marburg 11 Semester
Staatsexamen: 20. Dezember 1977
Promotion: 3. März 1978
Referent: Prof. Dr. F. H e s s
Correferent: Prof. Dr. Dr. W. T. K l ö t z e r

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Anwendung von Antiproteasen beim Walker-Karzinom 256 der Ratte. Die Versuche wurden an 15o - 2oo g schweren männlichen und weiblichen Spraque - Dawley Ratten durchgeführt. Anhand der Parameter Angehrate und Überlebensrate untersuchten wir die Beeinflußbarkeit des Tumors durch den polyvalenten Proteinasen - Inhibitor Aprotinin und die Antiprotease Heparin. Die Arbeit setzt sich aus einem diagnostischen und einem therapeutischen Teil zusammen. Im diagnostischen Teil versuchten wir der Frage nachzugehen, inwieweit die Theorie, daß der Organismus malignen Tumoren durch eine Erhöhung der Antiproteasen Widerstand entgegenzusetzen versucht, zutrifft.
Wir bestimmten dazu photometrisch die Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma gesunder und tumorkranker Tiere. Wir errechneten die Mittelwerte der einzelnen Tiergruppen und überprüften sie auf biologische Signifikanz.
Die Mittelwerte der einzelnen Tumorgruppen sind im Vergleich mit dem Mittelwert der Normalgruppe erhöht und nehmen mit steigendem Tumorgewicht zu.

Biologische Signifikanz liegt vor beim Vergleich der Tumorgruppe 0 - 5 g mit der Tumorgruppe 5 - 15 g und beim Vergleich der Tumorgruppe 5 - 15 g mit der Tumorgruppe 15 - 25 g.
Weitere diagnostische Untersuchungen bezogen sich auf die Blutgerinnung. Wir bestimmten die Gerinnungszeit nach der C l a u s s - Methode mit einem Fibrinogen-Bestimmungssatz und nach dem Prinzip von S o r i a über die Reptilase-Zeit.
Wir errechneten wiederum die Mittelwerte der einzelnen Tiergruppen und überprüften diese auf biologische Signifikanz.
Die Blutgerinnung ist bei den tumorkranken Ratten verzögert, biologische Signifikanz liegt aber nicht vor.
Die erhöhte Antichymotrypsin-Konzentration im Plasma tumorkranker Tiere und die verzögerte Blutgerinnung, die auf eine verstärkte Produktion von Antiproteasen, d.h. in diesem Fall von Antithrombinen, zurückgeführt werden könnte, waren Anlaß für uns, eine Antiproteasen-Therapie durchzuführen.
Im therapeutischen Teil unsere Arbeit stellten wir zuerst durch Nachweisversuche der von uns applizierten Antiproteasen sicher, daß diese nach i.p. Injektion auch resorbiert werden und an ihren Bestimmungsort, das Tumorgewebe, gelangen können. Die Nachweisversuche gaben außerdem Aufschluß darüber, wie lange der durch die injizierte Antiproteasen-Konzentration erhöhte Antiproteasen-Spiegel im Plasma vorhanden ist, und somit über das Zeitintervall zwischen zwei aufeinander folgenden Injektionen. Sie informierten uns weiterhin über den Zeitpunkt, bei dem das Maximum der Proteinasen-Inhibitor-Konzentration im Plasma vorhanden ist.

Im einzelnen wurden folgende Nachweise erbracht, die eindeutig positiv zu bewerten sind:

1. Aprotinin - Nachweis im Plasma, Konzentration 1o.ooo, 2o.ooo und 8o.ooo KIE.

2. Aprotinin - Nachweis im Urin, Konzentration 80.000 KIE.

3. Aprotinin - Nachweis im Tumor, Konzentration 20.000 und 80.000 KIE.

4. Heparin - Nachweis im Plasma, Konzentration 1000 und 2000 USP - E.

Den Nachweisversuchen schlossen sich die Therapieversuche mit Aprotinin und Heparin an.

Die Beeinflußbarkeit des Tumors wurde an den Parametern Angehrate und Überlebensrate gemessen.
Die durchgeführten Versuche zeigen, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen

1. die Angehrate des Tumors durch Aprotinin nicht beeinflußt werden kann,

2. die Überlebensrate der therapierten Tiere durch Aprotinin minimal verlängert werden kann,

3. die Überlebenszeit der therapierten Tiere durch Heparin ebenfalls minimal verlängert werden kann.

Eine statistische Auswertung der Therapieversuche erübrigte sich, da die mittleren Todestage der therapierten Tiere und der Vergleichstiere nur minimal differierten.

Als abschließende Wertung unserer Versuchsergebnisse bleibt festzustellen, daß die Anwendung von Antiproteasen gegen das Walker - Karzinom 256 der Ratte unter den vorliegenden Versuchsvariablen zu keinem Therapieerfolg führt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 ALLISON, A.C. MALLUCCI, L.:
Lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes
Lancet 11, 1371
1964

2 ATTARDI, D.G., SCHLESINGER, M.J., and SCHLESINGER, S.:
Submaxillary gland of mouse: properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro
Science, 155, 1253
1967

3 BERGMAYER, H. U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1021
1970

4 BERNHEIMER, A.W. und SCHWARTZ, L. :
Lysosomal disruption by bacterial toxins
J. Bacter., 87, 1100
1964

5 BLUNDELL, G.:
Alpha $_1$ - antitrypsin: phenotypes in Northern Ireland
Ann. Human. Genet. Lond., 38, 289
1975

6 BURGER, M.M., and GOLDBERG, A.R.:
Identification of a tumor - specific determinant on neoplastic cell surfaces
Proc. Nat. Acad. Sci. US., 57, 359
1967

7 BURGER, M.M.:
A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 62, 994
1969

8 BURGER, M.M.:
Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth
Nature, Vol. 227, July 11, 170
1970

9 BURGER, M.M. :
Surface changes in transformed cells detected by lectins
Fed. Proc., 32, 91
1973

10 BURGER, M.M. :
Biological membranes
edited by FOX, C.F., New York: Academic Press
1972

11 CHATTERJEE, S., and WALKER, I.O.:
The modification of deoxyribonucleohistone by trypsin and chymotrypsin
Eur. J. Biochem., 34, 519
1973

12 CHOU, I.N., BLACK, P.H., and ROBLIN, R.O.:
Non - selective inhibition of transformed cell growth by a protease inhibitor
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 1748
1974 b

13 CLIFFTON, E.E., and GROSSI, C.E.:
Fibrinolytic activity of human tumors as measured by the fibrin-plate method
Cancer, Vol. 8, No. 6, 1146
1955

14 DAVIES, P., REITA, G.A., KRAKAUER, K., and WEISSMANN, G.:
Characterization of a neutral protease from lysosomes of rabbit polymorphonuclear leukocytes
Biochem. J., 123, 559
1971

15 ERIKSSON, S.:
Studies in alpha $_1$ - antitrypsin deficiency
Acta Med. Scand., 432, 1
1965

16 ERSHOFF, B. H., and BAJWA, G.S.:
Submaxillary gland hypertrophy in rats fed proteolytic enzymes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 879
1963

17 FISCHER, A.:
Beitrag zur Biologie der Gewebszellen. Eine vergleichend - biologische Studie der normalen und malignen Gewebszellen in vitro.
Arch. Entwicklungsmechanik, 1o4, 21o
1925

18 FOX, T.O., SHEPPARD, J.R., and BURGER, M.M.:
Cyclic membrane changes in animal cells: transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., Vol. 68, No. 1, 244
1971

19 GOLDBERG, A.R.:
In conference on biomedical perspectives of agglutinins of invertebrate and plant origins
Annals of the New York Academy of Sciences meeting (New York), May 21 - 23
1973 a

2o GOLDBERG, A.R.:
Increased protease levels in transformed cells: a casein overlay assay for the detection of plasminogen activator production
Cell, Vol. 2, 95
1974

21 GOLDBERG, A.R.:
Involvement of cell and serum proteases in exposing tumor - specific agglutinin sites
Ann. N. Y. Acad. Sci., 234, 348
1974 a

22 GOODALL, D.M., PARDOE, G., and GREGORY, J.K.:
Lymphocyte surface components, stimulation of enzyme - treated rabbit lymphocytes by non - specific mitogens
Clin. Exp. Immunol., 9, 645
1971

23 GUENTER, C.A., WELCH, M.H., and HAMMARSTEN, J.F.:
Alpha $_1$ - antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema
Annu. Rev. Med., 22, 283
1971

24 GURNEY, T.:
Local stimulation of growth in primary cultures of chick embryo fibroblasts
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 62, 9o6
1969

25 HARRIS, C.C., PRIMACK, A., and COHEN, M.H.:
Elevated alpha $_1$ - antitrypsin serum levels in lung cancer patients
Cancer, 34, 28o
1974

26 HASELOFF, O.W., HOFFMANN, H.J.:
Kleines Lehrbuch der Statistik
4. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin
197o

27 HOZUMI, M., OGAWA, M., SUGIMURA, T., TAKEUCHI, T., and UMEZAWA, H.:
Inhibition of tumorigenesis in mouse skin by leupeptin, a protease inhibitor from actinomycetes.
Cancer Research, 32, 1725
1972

28 INBAR, M., and SACHS, L.:
Interaction of the carbohydrate-binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 63, 1418
1969 b

29 LATNER, A. L., LONGSTAFF, E., and PRADHAN, K.:
Inhibition of malignant cell invasion in vitro by a proteinase inhibitor
Br. J. Cancer, 27, 460
1973

30 LATNER, A. L., LONGSTAFF, E., and TURNER, G. A.:
Anti - tumour activity of aprotinin
Br. J. Cancer, 30, 60
1974

31 LATNER, A. L., TURNER, G. A., and LAMIN, M. M.:
Plasma alpha$_1$ - antitrypsin levels in early and late carcinoma of the cervix
Oncology, 33, 12
1976

32 MAGGI, V.:
A study of lysosomal acid phosphatase during mitosis in HeLa cells
J. Roy. Micr. Soc., 85, 291
1966

33 Mc ILHINNEY, A., and HOGAN, B.L.M.:
Effect of inhibitors of proteolytic enzymes on the growth of normal and polyoma transformed B H K cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 348
1974 a

34 OSSOWSKI, L., UNKELESS, J.C., TOBIA, A., QUIGLEY, J.P., RIFKIN, D.B., and REICH, E.:
An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses
J. Exp. Med., 137, 85
1973

35 QUIGLEY, J.P., OSSOWSKI, L., and REICH, E.:
Plasminogen, the serum proenzyme activated by factors from cells transformed by oncogenic viruses
Jour. Bio. Chem., Vol. 249, No. 13
1974

36 KAPIN,A. M. C., and BURGER, M.M.:
Tumor cell surfaces
Advances in Cancer Research, Vol. 2o, 47
edited by KLEIN, G., and WEINHOUSE, S., Academic Press
1974

37 KIFFIN, D.B., LOEB, J.N., MCCOY, G., and REICH, E.:
Properties of plasminogen activitors formed by neoplastic human cell cultures
J. Exp. Med., Vol. 139, 1317
1974

38 ROBBINS, E., and GONATAS, N.K.:
The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle
J. Cell Biol., 21, 429
1961

39 ROBLIN, R., CHOU, I., and BLACK, P.H.:
Proteolytic enzymes, cell surface changes, and viral transformation
Advances in Cancer Research, Vol. 22, 232, edited by KLEIN, G., and WEINHOUSE, S., Academic Press
1975

4o SCHNEBLI, H.P., and BURGER, M.M.:
Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 69, 3825
1972

41 SEELICH, F.:
Sind lysosomale Enzyme an der Regulation der Zellvermehrung beteiligt?
Österreichische Zeitschrift für Onkologie, Vol. 2, No. 2 - 3 , 31
1974

42 SEFTON, B.M., and RUBIN, H.:
Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes
Nature, Vol. 227, 843
1970

43 SELA, B., LIS, H., SHARON, N., and SACHS, L.:
Different locations of carbohydrate - containing sites in the surface membran of normal and transformed mammalian cells
J. Membrane Biol., 3, 267
1970

44 SHAMBERGER, R.J., and RUDOLPH, G.:
Increase of lysosomal enzymes in skin cancers
Nature, Feb 11, 617
1967

45 SHEPPARD, R.J.:
Difference in the cyclic Adenosine 3', 5' - Monophosphate levels in normal and transformed cells
Nature New Biol., Vol. 236, No. 61, 14
1972

46 SHIMOYAMA, M., NIITANI, H., TANIGUCHI, T., INAGAKI, J., and KIMURA, K.:
The role of lysosomes in cancer chemotherapy
III. Influence of plasmin on the lysosomes of tumor cells and on the cytocidal effect of Mitomycin - C
GANN, 60, 33, Feb
1969

47 SNYDER, S., and ASHWELL, G.:
Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy
Clin. Chim. Acta., 34, 449
1971

48 STOKER, M.G.P., and RUBIN, H.:
Density dependent inhibition of cell growth in culture
Nature, Vol. 215, 171
1967

49 STROUD, R.M.:
A family of protein - cutting proteins
Scientific American, 74, July
1974

50 SYLVÉN, B., SNELLMAN, O., and STRÄULI, P.:
Immunofluorescent studies on the occurrence of
Cathepsin B 1 at tumor cell surfaces
Virchows Arch. B Cell Path., 17, 97
1974

51 TCHÓRZEWSKI, H., SULOWSKA, Z., and DENYS, A.:
A new lymphocyte transforming factor derived
from the lysosomes of polymorphonuclear leukocytes
Experientia, 29/4, 481
1973

52 TOSI, L., and SCARANO, E.:
Effect of trypsin on DNA - methylation in isolated
nuclei from developing sea urchin embryos
Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 55, No. 2, 470
1973

53 TROLL, W., KLASSEN, A., and JANOFF, A.:
Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic
inhibitors of proteases
Science, Vol. 169, 1211
1970

54 UNKELESS, J.C., DANO, K., KELLERMANN, G.M., and
REICH, E.:
Fibrinolysis associated with oncogenic transformation;
partial purification and characterization of the cell
factor - a plasminogen activator
J. Biol. Chem., Vol. 249, No. 13, 4295
1974

55 WEISSMANN, G., DUKOR, P., and ZURIER, R.B.:
Effect of cyclic AMP on release of lysosomal enzymes
from phagocytes
Nature New Biol., 231, 131
1971

56 YAMAMOTO, K., OMATA, S., OHNISHI, T., and TERAYAMA, H.:
In vivo effects of proteases on cell surface
architecture and cell proliferation in the liver
Cancer Research, Vol. 33, 567, March
1973

L E B E N S L A U F

Am 31. August 1951 wurde ich, Rainer Kuhn, als Sohn des technischen Zeichners Helmuth K u h n und seiner Ehefrau Elsbeth, geborene K u d l o f f, in Eisenach/Thüringen geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Grundschule in Herleshausen, Kreis Eschwege.

1962 wechselte ich auf die Gerhart Hauptmann - Schule, Gymnasium in Sontra, Kreis Rotenburg, über, wo ich am 16. Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1. Oktober 1970 bis zum 30. Juni 1972 leistete ich meinen Wehrdienst als Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr in Fritzlar, Kreis Fritzlar - Homberg, und in Kassel ab.

Zu Beginn des Wintersemesters 1972/73 immatrikulierte ich mich für das Studium der Zahnmedizin an der Philipps - Universität in Marburg.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 31. August 1973.

Zahnärztliche Vorprüfung am 14. März 1975.

Zahnärztliche Prüfung am 20.Dezember 1977.

Zahnärztliche Bestallung am 17.Januar 1978.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren Professoren und Dozenten:

AHRENS
AMON
BALTZER
BERNHARDT
BODE
BRAASCH
CASTENHOLZ
DENNHARDT
DIMROTH
EIBEL
GALLWITZ
GOLENHOFEN
HABERICH
HENNIS
HENSEL
HERING
HEUSER
HILGERMANN
JANKE
KARLSON
KLÖTZER
KOECKE
KORANSKY
LEHMANN
LUDWIG
MANNHEIM
MAROSKE
MÜLLER
NIEMEYER
PERST
PETRY
PRIEBE
RICHTER
ROHEN
RUPEC
SCHACHTSCHABEL
SCHIENBEIN
SCHIFF
SCHMIDT
SCHMITZ - MOORMANN
SCHNEIDER
SCHULTE - HERMANN
SEIFART
THOENES
WALCHER
WENDT
WESEMANN
WIEGANDT